



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Función de la proteína IFI27 sobre la
actividad del Receptor Nuclear de
Estrógenos alfa

T E S I S

Que para obtener el título de:
Maestría en Ciencias Bioquímicas

P R E S E N T A :

Perla Vanessa Danaé Maqueda Márquez



México D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Felix Recillas Targa
Vocal	Dr. Horacio Merchant Larios
Secretario	Dra. Ma. Imelda López Villaseñor
1er. Suplente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
2°. Suplente	Dra. Marta Menjívar Iraheta

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio B- 046 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Alfonso León del Río.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Gracias Dios por darme vida y salud, por permitirme llegar a esta etapa de mi formación académica y por darme la oportunidad de conocerte.

A MIS PADRES

Por ser un ejemplo a seguir, por siempre estar dispuestos a escuchar mis problemas y darme los mejores consejos, por darme el mejor regalo que una hija pueda desear, la vida.

A MI HERMANA

Por hacerme reconocer mis errores y ofrecerme siempre tus vivencias. Quisiera que esta tesis fuera un impulso para ti, para que concluyas con éxito tu carrera.

A MI TÍA MARY

Gracias Mary, ya sabes que tu eres como mi mamá, eres incondicional, gracias por siempre encontrar una solución a todo y ver la vida como un juego.

A MI ESPOSO SERGIO

Gracias Serch por querer lo mejor para mi, por defenderme ante todos, por darme siempre tus consejos, por impulsarme cada día a ser la mejor, por ofrecerme tu amor en cada beso y en cada caricia.

AL DR. ALFONSO

Gracias por brindarme tanto conocimiento, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por apoyarme a conseguir mis metas y anhelos.

A MIS COMPAÑEROS

Cynthia, Tonatiuh, Anylú, Ivan, Rafael, Sandra y Alberto.
Por brindarme su amistad y confianza, por ayudarme con mis experimentos, por ofrecerme su conocimiento, ah y por ayudarme a buscar el titrato.

AL DR. NORIEGA Y
COLETTE

Por apoyarme tanto en mi vida académica como personal, por darme tan sabios consejos, por impulsarme a seguir adelante con inteligencia.

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS.....	8
1 ANTECEDENTES.....	11
1.1 Familia de los Receptores Hormonales Nucleares.....	13
1.1.1 Clasificación de los Receptores Hormonales Nucleares.....	13
1.1.2 Estructura de los Receptores Hormonales Nucleares.....	15
1.1.2.1 Dominio A/B y AF-1.....	16
1.1.2.2 Dominio de unión a DNA.....	18
1.1.2.3 Dominio de unión a ligando.....	19
1.1.3 Localización celular de los Receptores Hormonales Nucleares y la Integridad de sus dominios.....	20
1.2 Receptor Nuclear de Estrógenos (ER).....	20
1.2.1 Diferencias entre el ER α y ER β	21
1.2.2 La importancia fisiológica de los estrógenos.....	22
1.2.3 El Receptor de Estrógenos y el Cáncer de mama.....	22
1.2.4 Tamoxifén, función sobre el ER y su relación con el cáncer de mama...	24
1.2.5 Mecanismo de acción del ER α	25
1.3 Coactivadores y Co-represores.....	26
1.3.1 Miembros de la familia p160.....	26
1.3.2 CBP/p300.....	29
1.3.3 Otras proteínas coactivadoras.....	31
1.3.4 Co-represores.....	31
1.3.5 La región AF-1 y AF-2 de ER α y su interacción con coactivadores y co-represores.....	33
1.4 Proteína inducida por interferón α (IFI27).....	34
2 HIPÓTESIS	36
3 OBJETIVOS GENERAL y PARTICULARES.....	37
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1 Clonación de factores Nucleares que interaccionan directamente con la región AF-1 de ER α humano por el método de doble híbrido.....	38
4.2 Clonación de la proteína IFI27 en el vector pcDNA 3.1 (+).....	39
4.3 Cultivos celulares.....	43
4.4 Transfecciones transitorias.....	43
4.5 Ensayo de luciferasa y β -galactosidasa.....	44
4.6 Análisis estadístico de las transfecciones transitorias.....	45
4.7 Validación del anticuerpo comercial de IFI27.....	46
4.8 Inmunolocalización.....	47
4.9 Precipitación de DNA.....	48
4.10 Transformación por choque térmico.....	48

4.11 Minipreparaciones.....	48
4.12 Maxipreparaciones.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Clonación del cDNA de IFI27.....	50
5.2 Western Blot.....	51
5.3 Inmunolocalización de IFI27 en células humanas.....	52
5.4 Expresión y caracterización de IFI27 en células humanas.....	56
6 DISCUSIÓN.....	62
7 CONCLUSIONES	65
8 PERSPECTIVAS.....	66
9 REFERENCIAS.....	67
10 APÉNDICE.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los Receptores Hormonales Nucleares.

Figura 2. Familia de los Receptores Hormonales Nucleares.

Figura 3. Esquema de los dominios del ER α y sus sitios de fosforilación en respuesta a un

estímulo de estradiol o a una cascada de señalización de segundos mensajeros.

Figura 4. Esquema de una glándula mamaria humana y los diferentes tipos de tumores dependiendo del tejido en donde se desarrollen.

Figura 5. Miembros de la familia p160.

Figura 6. Estructura de la familia CBP/p300.

Figura 7. Estructura sinérgica entre la región AF-1 y AF-2 y la unión de coactivadores.

Figura 8. Vector pcDNA 3.1(+).

Figura 9. Amplificación por PCR del cDNA de IFI27.

Figura 10. Reacción de digestión con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* de las clonas 1, 2, 3 y 4 de

IFI27.

Figura 11. Western Blot. Extractos totales de células HepG2 y MCF7. Inmunodetección de

las proteínas IFI27 y ER con anticuerpos comerciales.

Figura 12. Ensayo de inmunofluorescencia con células HepG2 y MCF7 con y sin estímulo

de estradiol.

Figura 13. Curva de estandarización de ER en células HepG2.

Figura 14. Curva de estandarización de ERE en células HepG2.

Figura 15. Curva de estandarización de IFI27 en células HepG2.

Figura 16. Comparación del aumento en la actividad de ER al transfectar IFI27, SRC1 y

ERAP1 en células HepG2.

Figura 17. Modelo de interacción de la proteína IFI27 con el ER y otros co-activadores.

ABREVIATURAS

AD1	Dominio autónomo de activación transcripcional 1
AD2	Dominio autónomo de activación transcripcional 2
AF-1	Función de activación 1
AF-2	Función de activación 2
AML	Anemia mielocítica aguda
Amp	Ampicilina
AP1	Gen de la apolipoproteína 1
AR	Receptor de andrógenos
ATP	Adenosil trifosfatasa
bHLH	Motivo básico hélice asa hélice
CARM1	Co-activador asociado a metil- transferasa de arginina
CBP	Proteína de unión a CREB
CH1, CH2 y CH3	Regiones ricas en cisteínas histidinas
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CMV	Citomegalovirus
DBD	Dominio de unión al DNA
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DRIP	Proteína que interacciona con la vitamina D
E2	Estradiol
ERAP- 1	Proteína 1 Asociada al Receptor de Estrógeno
ER	Receptor de estrógenos
ERAP	Proteínas asociadas al receptor de estrógenos
ERE	Elemento de Respuesta a Estrógeno
FBS	Suero fetal bovino
GAL4	Activador transcripcional galactosidasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GR	Receptor de glucocorticoides
HAT	Acetil- transferasa de histonas
HDAC	Desacetilasa de histonas
HeBS	Buffer HEPES
HepG2	Línea celular de hepatoblastoma de humano
His	Histidina
HRE	Elemento de respuesta a estrógenos
IFI27, p27 o ISG12	Proteína inducida por interferón α
IFN	Interferón
IGF-1	Factor de crecimiento de insulina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
ISGs	Genes inducidos por interferón
kDa	Kilodaltones
KIX	Sitio de unión para el factor de transcripción CREB
LacZ	Gen de la lactosa
LB	Medio Luria Bacterias
LBD	Dominio de unión a ligando
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno

MCF7	Línea celular de cáncer de glándula mamaria
MEM	Medio mínimo esencial
MR	Receptor de mineralcorticoides
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NCoR	Co-represor del receptor nuclear
NFκβ	Factor nuclear kappa beta
NID	Dominio de interacción con los receptores nucleares
NIDAF-1	Dominio AF-1 de interacción con el receptor nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
NR	Receptor nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
O/N	Toda la noche
PAS	"Period protein self association domain" (siglas en ingles)
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Receptor de progesterona
PSA	Gen del antígeno prostático
PVDF	Membrana de fluoruro de polivinilideno
RAR	Receptor del ácido retinóico
REA	Represor de la actividad del receptor de estrógenos
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
RTS	Síndrome Rubinstein Taybi
RXR	Receptor Nuclear activado por el ácido retinóico 9-cis
Ser	Serina
SID	Dominio coactivador de interacción con receptores esteroideos 1
SMRT	Mediador del silenciamiento de los receptores retinóico y tiroideo
SP1	Proteína de almacenaje 1
SRC	Co-activadores de receptores de hormonas esteroideas
SRC-1 o NCoA-1	Co-activador del receptor de la hormona esteroide 1
SRC-3 p/CIP, RAC3, ACTR, TRAM-1 o AIB-1	Co-activador del receptor de la hormona esteroide 3
SRF	Factor de respuesta a suero
SSA	Secretaría de Salud
TA	Temperatura ambiente
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TFIIB	Factor de transcripción II B
TFIIH	Factor de transcripción II H
Thr	Tirosina
TIF-2 o GRP-1	Factor intermedio de la transcripción
TOT	Tamoxifén
TR	Receptor tiroideo

TRAP	Proteína asociada al receptor tiroideo
UV	Ultravioleta
Y2H	Doble híbrido en levadura

ANTECEDENTES

Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Los factores de transcripción interactúan con regiones específicas del DNA, con elementos de la maquinaria de transcripción como la RNA polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad. Conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales. La diferenciación celular depende de la expresión de un patrón específico de genes, lo que está en gran medida determinado por el perfil de factores de transcripción expresados en cada tipo celular. Dentro de este perfil hay factores de transcripción constantemente activos responsables de la expresión de los genes constitutivos, y hay otros que se activan o inhiben en respuesta a estímulos externos. La activación de complejas cascadas de señalización intracelular desemboca en muchos casos en la activación o supresión de uno o varios factores de transcripción que van a orquestar una respuesta determinando el patrón de genes expresados por la célula.

Tal es el caso del Receptor de Estrógenos (ER), el cual es un factor de transcripción que regula positiva o negativamente la expresión de genes activados por estrógenos. La regulación transcripcional mediada por el ER requiere de otras proteínas llamadas cofactores. La interacción del ER con estas proteínas resulta en cambios en la estructura de la cromatina que impide o facilita el ingreso de la RNA polimerasa y la maquinaria basal de la transcripción iniciando o reprimiendo la expresión genética.

En el humano el ER tiene un papel esencial debido a que participa en la regulación de muchos procesos biológicos como la reproducción, homeostasis metabólica, crecimiento, diferenciación celular, entre otros. Sin embargo, es su relación con el cáncer por lo que este factor es mayormente estudiado. En los últimos 30 años se ha comprobado que la actividad del ER está relacionada con los procesos de transformación y proliferación celular principalmente en el cáncer de mama.

El ER como la mayoría de los factores de transcripción tiene una naturaleza modular. Esto significa que está formado por regiones que tienen funciones diferentes. La región carboxilo-terminal del ER se caracteriza por contener a la región de unión a ligando (LBD), la región de unión a DNA y la Función de Activación Transcripcional 2 (AF-2).

Esta última región es la responsable del reclutamiento de la mayoría de los cofactores identificados, por lo que juega un papel fundamental en la remodelación de la cromatina y la regulación transcripcional. Sin embargo, el ER posee otra Función de Activación Transcripcional denominada AF-1. Aunque el dominio AF-1 ha sido relacionada con la formación de tumores y resistencia al tratamiento en el cáncer de mama sus funciones permanecen aún en buena medida desconocidas. Por esta razón al inicio de esta investigación el laboratorio del Dr. León propuso identificar a los factores celulares capaces de reconocer y unirse al dominio AF-1. En esta tesis describo la función de uno de estos factores al que previamente se le había denominado Proteína inducida por interferón (IFI-27).

Los resultados de mi tesis demuestran que esta proteína es internalizada al núcleo celular en donde interactúa con el dominio AF-1 de ER aumentando su actividad transcripcional.

1.1 Familia de los Receptores Hormonales Nucleares.

Los receptores hormonales nucleares (RHN) comprenden una superfamilia de proteínas de unión a DNA, reguladoras de la transcripción o también llamados factores de transcripción, los cuales controlan la expresión de gran cantidad de genes (Evans *et al.*, 1988; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Urnov *et al.*, 2001).

La actividad de estos receptores está regulada por la unión de ligandos hormonales, los cuales llevan a cabo un cambio alostérico conformacional en la estructura de la proteína que permite la unión con el DNA.

Los RHN controlan gran cantidad de procesos biológicos como la homeostasis, reproducción, desarrollo embrionario, crecimiento, diferenciación celular, metabolismo y muerte celular. Una desregulación en las vías de señalización de estos receptores conlleva a la generación de enfermedades de tipo proliferativas, reproductivas y metabólicas, como por ejemplo, cáncer, infertilidad, obesidad y diabetes, entre otras. (Gronemeyer *et al.*, 2004).

1.1.1 Clasificación de Receptores Hormonales Nucleares

Existen varios reportes sobre la clasificación de los RHN, en general éstos se han dividido en tres subfamilias de acuerdo a su capacidad de unirse al DNA dependiente o independiente de su ligando y en función a su dimerización para unirse al DNA.

Los receptores de Tipo I, conocidos como receptores esteroides incluyen al receptor de estrógenos (ER), al receptor de glucocorticoides (GR), al receptor de mineralcorticoides (MR), al receptor de progesterona (PR) y al receptor de andrógenos (AR), los cuales son translocados al núcleo en respuesta a la unión de su ligando; en ausencia de ligando, se asocian a proteínas de choque térmico, las cuales se encuentran unidas a los receptores evitando el plegamiento o la agregación, generando un estado no activo, es decir, no presentan influencia sobre la activación de la transcripción de sus genes blanco (Griekspoor *et al.*, 2007). Los receptores esteroides reconocen secuencias específicas de DNA en una forma dimérica, es decir, unión de dos receptores, únicamente en presencia de su ligando.

Cada receptor reconoce diferentes tipos de ligandos, el receptor de estrógenos, une estradiol, el receptor de glucocorticoides, une cortisol y corticosterona, el receptor a

mineralcorticoides, una aldosterona, el receptor de progesterona una progesterona, y el receptor de andrógenos una testosterona y dihidrotestosterona (Griekspoor *et al.*, 2007).

Los receptores Tipo II comprenden al receptor tiroideo (TR), al receptor del ácido retinóico trans (RAR), al receptor de ácido retinóico cis (RXR) y al receptor de Vitamina D₃ (VDR) (Mangelsdorf *et al.*, 1995), los cuales son capaces de unirse al DNA en ausencia de su ligando y generalmente lo hacen como heterodímeros con el RXR (Kraus *et al.*, 2002).

Existe una tercera clase de RHN, los cuales se conocen como receptores hormonales huérfanos, cuyos ligandos aún no han sido identificados, éstos se pueden unir al DNA de forma mono y dimérica (Figura 1).

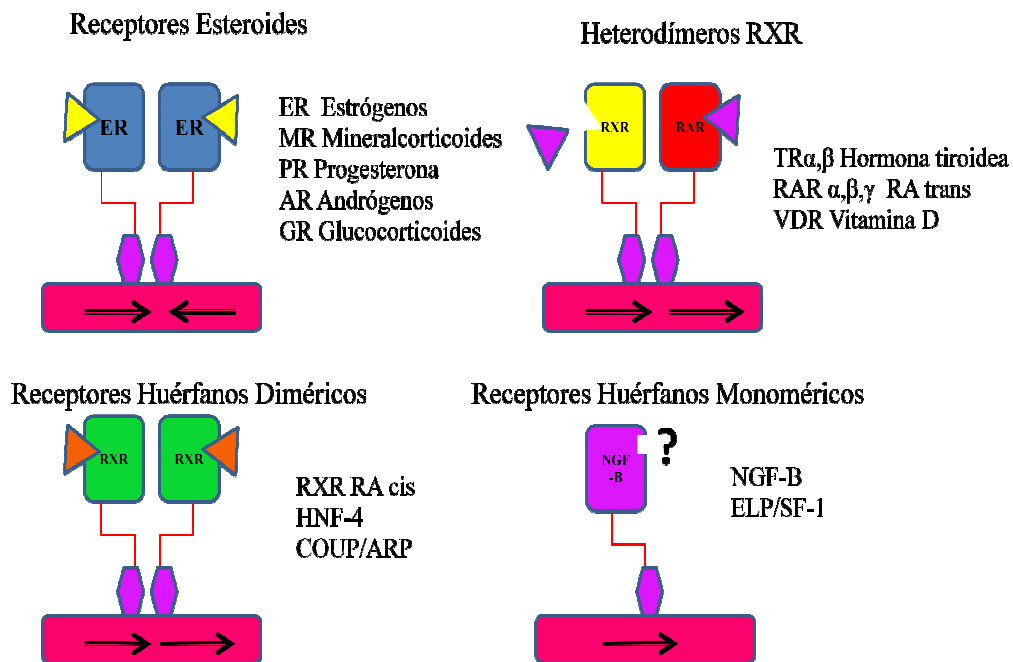


Figura 1. Clasificación de los Receptores Hormonales Nucleares (Basado en el esquema de Mangelsdorf *et al.*, 1995).

1.1.2 Estructura de los Receptores Hormonales Nucleares

Los RHN están compuestos por varios dominios funcionales independientes. Su estructura se caracteriza por presentar seis dominios: A, B, C, D, E y F.

El dominio A/B, el cual contiene a la función de activación 1 (AF-1 por sus siglas en inglés: “Activating Function 1”), se localiza en la región amino terminal y es la región menos conservada.

El dominio C, también llamado dominio de unión al DNA (DBD por sus siglas en inglés: “DNA Binding Domain”), es la región responsable de la unión al DNA, se sitúa en la parte central de la proteína y es la más conservada desde el punto de vista de su secuencia de aminoácidos entre los receptores hormonales nucleares.

El dominio D es una región que sirve como puente flexible y contiene una señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés: “Nuclear Localization Signal”).

El dominio E o también llamado dominio de unión a ligando (LBD por sus siglas en inglés: “Ligand Binding Domain”), es una región moderadamente conservada que contiene a la Función de Activación 2 (AF-2 por sus siglas en inglés: “Activating Function 2”), la cual recluta una serie de co-reguladores que facilitan o inhiben la activación transcripcional.

El dominio F, se encuentra presente sólo en el receptor de estrógenos alfa, localizado en la región carboxilo terminal y su función es aún desconocida (Figura 2).

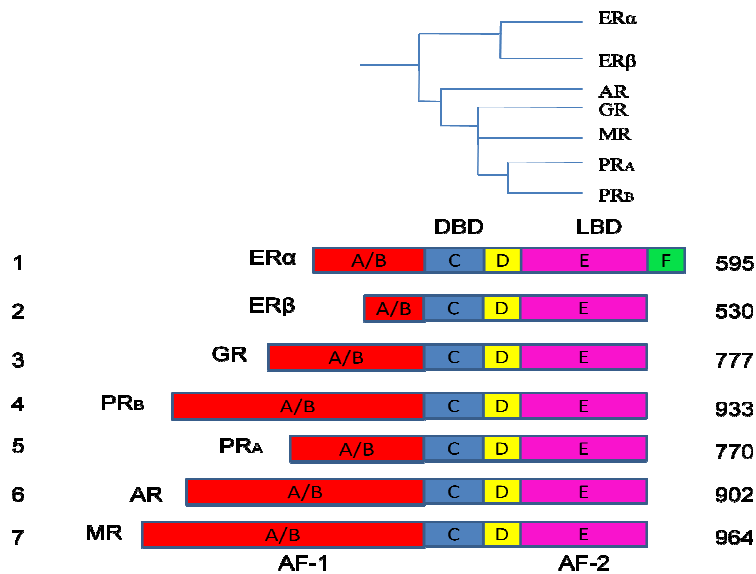


Figura 2. Familia de los Receptores Hormonales Nucleares. 1) Receptor de Estrógenos alfa; 2) Receptor de Estrógenos beta; 3) Receptor de Glucocorticoides; 4) Receptor de

Progesterona B; 5) Receptor de Progesterona A; 6) Receptor de Andr6genos; 7) Receptor de Mineralcorticoides; A/B, C, D, E y F Dominios funcionales de los Receptores Hormonales Nucleares; DBD Dominio de Uni3n al DNA; LBD Dominio de uni3n a ligando; AF-1 Funci3n de Activaci3n 1; AF-2 Funci3n de Activaci3n 2 (Basado en el esquema de Griekspoor *et al.*, 2007).

1.1.2.1 Dominio A/B y AF-1

El dominio A/B, localizado hacia la regi3n amino terminal, es un dominio poco conservado, contiene el factor de *trans*-activaci3n AF-1, el cual varía en longitud y secuencia entre los diferentes receptores hormonales nucleares, es reconocido por co-reguladores y por otros factores de transcripci3n (Gronemeyer *et al.*, 2004). Hasta el momento no se ha podido conocer la estructura de este dominio por medio de su cristalizaci3n debido a su alta variabilidad estructural (Griekspoor *et al.*, 2007).

Este dominio es blanco de fosforilaciones y otras modificaciones post-traduccionales mediadas por diferentes vías de seálalizacion, lo que ocasiona cambios en la actividad transcripcional del receptor.

Los residuos de serina, treonina y tirosina son los sitios específcos para la fosforilaci3n y la sumoilaci3n, mientras que los residuos de lisina son blanco para la acetilaci3n y la ubiquitinaci3n, localizados en la regi3n central entre el DBD y el LBD.

Algunos laboratorios correlacionan la fosforilaci3n de la Ser-514 de AR, posiblemente por una MAPK, con un incremento en la transcripci3n del gen del antígeno prostático (PSA).

Algunos autores, como Wang en el ańo 2002, demostraron que el GR se localiza en el citoplasma cuando se fosforila en la Ser-203 y su localizaci3n cambia a ser tanto citoplásmica como nuclear cuando se fosforila en la Ser-211, lo que apoya la hip3tesis que la fosforilaci3n de diversos sitios altera la localizaci3n intracelular y posiblemente también su funci3n.

Tanto ER α como ER β son fosforilados en los residuos de serina y treonina de la regi3n N-terminal. La fosforilaci3n de la Ser-87 de ER β y sus correspondientes, la Ser-104 y Ser-106 de ER α junto con la Ser-118 se ha visto que son importantes para la activaci3n de la transcripci3n independiente de ligando y para el reclutamiento de co-activadores en esta regi3n AF-1 (Tremblay *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Dutertre *et al.*, 2003).

La Ser-87 de ER β y Thr-311 de ER α son sustratos de MAPK (Tremblay *et al.*, 1999), mientras que la Ser-118 de ER α es sustrato del factor general de transcripción TFIIH/cinasa dependiente de ciclina (Chen *et al.*, 2000) (Figura 3).

Existe una gran variedad de combinaciones, pero en general las modificaciones post-traduccionales que sufren los receptores hormonales resultan en cambios de localización intracelular, activación y unión de proteínas hacia la región AF-1 (Lavery *et al.*, 2005).

Existen reportes donde demuestran que la unión de algunas proteínas reguladoras a esta región genera un cambio en la estructura de este dominio y por lo tanto se ve reflejado ya sea de manera positiva o negativa en la transcripción de los genes blanco, aunque aún se desconoce mucha información sobre este tema.

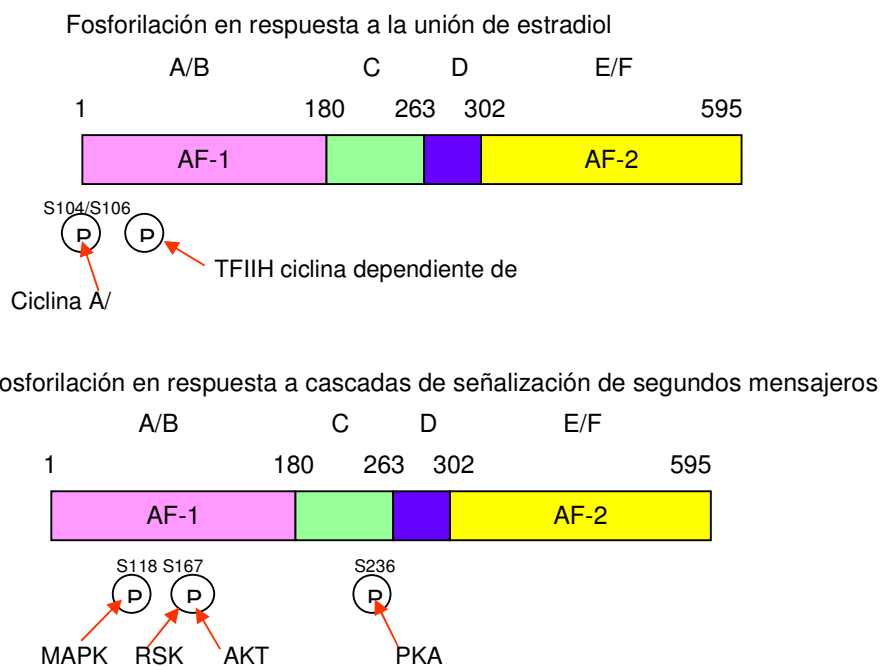


Figura 3. Esquema de los dominios del Receptor de Estrógenos alfa y sus sitios de fosforilación en respuesta a un estímulo de estradiol o a cascadas de señalización de segundos mensajeros. A/B, C,D,E,F Dominios funcionales del Receptor de Estrógenos; AF-1 y 2 Función de Activación 1 y 2; CDK Ciclina A dependiente de cinasa; TFIIH Factor de transcripción; MAPK Proteína cinasa activada por mitógeno; RSK Cinasa ribosomal 6; AKT Proteína cinasa B; PKA Proteína cinasa A (Basado en el esquema de Lannigan *et al.*, 2002).

1.1.2.2 Dominio de unión a DNA

Este dominio es el más conservado, se encuentra localizado en la región central de la proteína, está formado por ocho cisteínas las cuales coordinan dos iones de Zinc, cada uno formando un arreglo tetraédrico con cuatro cisteínas. Este dominio contiene dos dedos de zinc que se doblan para formar un dominio estructural sencillo, los cuales son el mecanismo por medio del cual los receptores se unen al DNA, un dedo de Zn es el responsable para el reconocimiento de secuencias blanco mientras que el otro está involucrado en la dimerización y orientación del receptor.

Su estructura la componen dos hélices alfa, las cuales se mantienen unidas a través de cadenas laterales hidrofóbicas empaquetadas (Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). Este dominio también contiene una caja P, la cual es un motivo corto, responsable de la dimerización de la proteína y de la especificidad para unirse a regiones de DNA.

Los Receptores Nucleares regulan la transcripción a través de la unión a regiones específicas de DNA de sus genes blanco, conocidas como elementos de respuesta hormonal (HRE, por sus siglas en inglés: “Hormone Responsive Element”). Estos elementos se encuentran localizados en las regiones reguladas hacia el extremo 5´ de los genes blanco; frecuentemente estos elementos se sitúan relativamente cerca de la parte central del promotor, otras veces forman parte de enhancers, algunas kilobases río arriba del sitio de inicio de la transcripción, las dos secuencias consenso que son reconocidas por los receptores son AGAACA para el caso de AR, PR, GR y MR y AGGTCA para el caso de ER, la mayoría de los receptores se une de forma homo o heterodimérica a estos HREs compuestos por dos motivos hexaméricos.

Los receptores hormonales se unen típicamente a estas regiones palindrómicas separadas por tres nucleótidos. A diferencia de los receptores esteroides, que sólo pueden reconocer secuencias palindrómicas, los no esteroides pueden unirse a HREs con diferentes configuraciones (Aranda *et al.*, 2008).

1.1.2.3 Dominio de unión a ligando

El dominio localizado hacia la región carboxilo terminal, moderadamente conservado entre los RHN, es el dominio de unión a ligando (LBD), está compuesto por 12 hélices alfa, formando tres capas de hélices antiparalelas, que conforman una cavidad conocida

como la bolsa de unión a ligando, donde, como su nombre lo indica, se sitúa el ligando, ésta región es altamente hidrofóbica.

Este dominio juega un papel muy importante en la translocación nuclear, en la unión de chaperonas, en la dimerización del receptor y en el reclutamiento de co-reguladores a través de su factor de activación dependiente de ligando (AF-2) (Griekspoor *et al.*, 2007). Este dominio es el que tiene la capacidad para reconocer a la hormona y realizar un cambio entre el estado no activo hacia un estado transcripcionalmente activo (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

1.1.3 Localización celular de los Receptores Hormonales Nucleares y la integridad de sus dominios

La localización subcelular de los Receptores Hormonales Nucleares ha sido estudiada a través de fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP), debido a estos estudios se identificó a ER α y ER β predominantemente en el núcleo (Htun *et al.*, 1999), GR y AR en el citoplasma (Georget *et al.*, 1997; Htun *et al.*, 1996), mientras que MR y PR se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fejes-Toth *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1999), todos antes de unirse a su ligando.

Se ha observado que la distribución uniforme de ER-GFP en el núcleo antes de unirse a su ligando, cambia hacia una distribución localizada una vez que se agrega, ya sea un agonista o un antagonista al medio, años más tarde, se observó el mismo patrón para GFP-GR, así como para otros Receptores Hormonales Nucleares. Trabajos con MR y AR demostraron que es necesaria la presencia del DBD y del LBD, así como la influencia de AF-1, para la distribución localizada (Farla *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2003; Pearce *et al.*, 2002; Tomura *et al.*, 2001; Tyagi *et al.*, 2000).

1.2 Receptor Nuclear de Estrógenos (ER)

El Receptor Nuclear de Estrógenos (ER) es un factor de transcripción que pertenece al grupo de los receptores hormonales nucleares tipo I, su función es regular la transcripción de genes que responden a estradiol (E₂).

Existen dos isoformas de ER, siendo un producto de genes distintos localizados en diferentes cromosomas, el Receptor de Estrógenos alfa (ER α) se localiza en el cromosoma 6, mientras que el Receptor de Estrógenos beta (ER β), se localiza en el

cromosoma 14, ambos comparten características y funciones similares, sin embargo, también presentan características particulares.

1.2.1 Diferencias entre ER α y ER β

Hace 30 años aproximadamente se creía que el ER α era el único mediador de los efectos fisiológicos de los estrógenos, sin embargo en 1996 se descubrió un nuevo ER presente en la próstata de rata, al cual se le nombró ER β , para distinguirlo del otro receptor (Kuiper *et al.*, 1996; Enmark *et al.*, 1999; Muramatsu *et al.*, 2000).

Comparten un 97% de similitud en su secuencia en el DBD, sin embargo, con respecto al LBD comparten solamente un 55 % de similitud en su secuencia peptídica, en cuanto a las regiones involucradas en la unión a ligando y AF-2, comparten un alto grado de similitud en su secuencia, y la diferencia más notable entre ambos es que ER α es el único receptor hormonal nuclear que presenta hacia el extremo carboxilo un dominio F. Con respecto a su capacidad de unión a ligando, ER β une con mayor afinidad estradiol que ER α , sin embargo, ER α tiene una mayor capacidad de unirse a EREs y activar la transcripción de sus genes blanco, por otro lado, ER β a diferencia de ER α , interacciona de manera independiente de ligando, con SRC-1, un co-activador del dominio AF-2 (Pettersson *et al.*, 2001).

Ambos poseen hacia la región N-terminal el factor de activación 1, sin embargo, el dominio AF-1 de ER β no es capaz de iniciar la transcripción de manera autónoma, a diferencia del dominio AF-1 de ER α , además, el dominio AF-2 de ER β induce la transcripción de promotores que contengan la caja TATA de manera menos eficiente que el dominio AF-2 de ER α .

1.2.2 La importancia fisiológica de los estrógenos

Además del papel que llevan a cabo los estrógenos en la reproducción, también realizan su función sobre diferentes tejidos en las mujeres, por ejemplo, en la glándula mamaria, en hueso, en el sistema cardiovascular, etc.

El estradiol (E_2) se sintetiza en las células granulosas de los ovarios maduros, aunque también puede ser sintetizado en las células adiposas, en músculo esquelético, en la piel, en folículos pilosos y en hueso.

Los estrógenos son muy importantes en el mantenimiento de la masa ósea, esto se observó, debido al riesgo que presentan las mujeres post-menopáusicas de tener fracturas de hueso, y a la disminución del riesgo al administrar terapia de reemplazo hormonal con estrógenos (Pinkerton *et al.*, 1999).

Por otro lado, después de la menopausia, aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, de igual forma, al administrar terapia de reemplazo hormonal, se reduce el riesgo de presentar este tipo de enfermedad (Mendelsohn *et al.*, 1999).

Con respecto a la glándula mamaria, el $ER\beta$ se encuentra presente de manera ubicua en todos los estadios de desarrollo, mientras que $ER\alpha$ fluctúa su presencia dependiendo del estadio de desarrollo, mostrando un incremento durante la pubertad, declinando gradualmente durante el embarazo, presenta una sobrerregulación durante la lactancia y declina otra vez después de la lactancia (Pettersson *et al.*, 2001).

Una función muy importante que llevan a cabo los estrógenos es la de activación transcripcional de ciertos genes a través de su unión a factores de transcripción, como es el caso del ER, esta unión permite el reclutamiento de diversos cofactores que a su vez favorecerán o inhibirán el acceso de la maquinaria de transcripción al promotor del gen para activar o reprimir su transcripción, éste proceso se lleva a cabo en células en proliferación acelerada de glándula mamaria, es decir, todo este mecanismo se realiza como una desregulación de los procesos normales y se conoce como la generación de una neoplasia de glándula mamaria.

1.2.3 El Receptor de Estrógenos y el cáncer de mama.

El cáncer de glándula mamaria es una de las neoplasias más importantes en el mundo. En Estados Unidos se reportan más de 211,000 casos nuevos cada año, y en México, análisis realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que el cáncer de mama es la segunda causa de mortalidad provocada por tumores malignos en mujeres en edad reproductiva, después del cáncer cérvico uterino. (INEGI/SSA).

El cáncer es la proliferación acelerada y descontrolada de células cuyos genes se encuentran mutados en algunos casos, en otros, existe daño a nivel epigenético, donde no hay cambios en el DNA, sino en la estructura de la cromatina, estas alteraciones ya

sea a nivel genético o epigenético actúan normalmente suprimiendo o estimulando el ciclo celular, así como la activación de oncogenes o inhibición de la actividad transcripcional de genes supresores de tumores.

La palabra cáncer, se aplica a las neoplasias malignas que se originan en estirpes celulares de origen epitelial o glandular, los llamados carcinomas de mama son adenocarcinomas, ya que derivan de células de estirpe glandular (de secreción externa). Existen dos tipos de cáncer de mama, el carcinoma ductal, presente en el 90% de los casos, donde la neoplasia maligna se encuentra en el interior de los conductos lácteos y el carcinoma lobulillar, presente en el 10 % de los casos restantes donde el cáncer tiene su origen en los acinos glandulares o lóbulos (Figura 4).

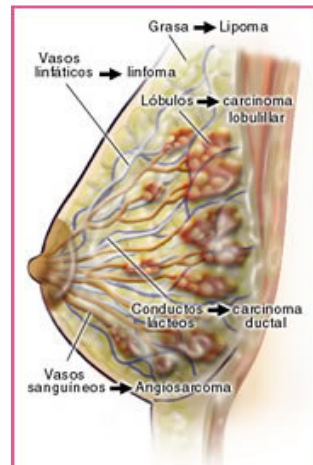


Figura 4. Esquema de una glándula mamaria humana y los diferentes tipos de tumores dependiendo del tejido en donde se desarrollen. Las líneas indican el tejido, mientras que las flechas indican el nombre del tumor.

El crecimiento y diseminación del 80% de los tumores de cáncer de mama dependen de los estrógenos, cuyos efectos son mediados por el ER α .

Estudios realizados *in vivo* han demostrado que en glándulas de mama normal el ER α no se expresa en células epiteliales en proliferación, lo que indica que el crecimiento de las células no es debido al efecto estimulador del E₂ (Saji *et al.*, 2000; Zeps *et al.*, 1998; Zeps *et al.*, 1999), sin embargo los tumores de cáncer de mama que expresan ER α si responden a E₂, ocasionando la proliferación celular.

1.2.4 Tamoxifén, función sobre el ER y su relación con el cáncer de mama

El fármaco más utilizado hoy en día para el tratamiento del cáncer de mama es un antagonista parcial del receptor de estrógenos, llamado tamoxifén (TOT), el cual posee una estructura similar al estradiol.

El primer estudio clínico registrado con TOT en pacientes con cáncer de mama en etapas muy avanzadas comenzó en 1969 (Cole *et al.*, 1971), y hasta hoy en día se ha visto que produce beneficios significativos en términos de reducción del cáncer de mama.

El efecto antitumoral del TOT se debe a su efecto anti-estrogénico, compite con el E₂, inhibiendo la unión de éste al receptor de estrógenos (Wakeling *et al.*, 1984), el complejo TOT-ER forma un homodimero y se une al ERE de los genes sensibles a estrógenos (Howell *et al.*, 2000), cabe aclarar que solamente el dominio AF-1 de ER se encuentra activo, la falta de actividad de AF-2 por la unión del TOT, resulta en una atenuación de la transcripción del gen blanco, debido a que se impide el reclutamiento de co-activadores a esta dominio; como resultado, el TOT bloquea la fase G1 del ciclo celular, disminuyendo la proliferación celular (Clemons *et al.*, 2002).

El TOT puede afectar a células epiteliales malignas de mama indirectamente modulando los niveles de citocinas de manera local y sistémicas (Colletta *et al.*, 1994), el TOT también estimula la producción del factor de crecimiento inhibitorio (Butta *et al.*, 1991), el cual actúa de manera parácrina negativamente sobre células de carcinoma de mama (Colletta *et al.*, 1994), además de reducir la síntesis del factor de crecimiento de insulina (IGF-1) (Ho *et al.*, 1998), el cual actúa como un potente mitógeno en el cáncer de mama (Cullen *et al.*, 1992), también posee efectos angiogénicos (Haron *et al.*, 1994).

A pesar de que produce efectos benéficos significativos en contra del cáncer de mama, también presenta efectos adversos, uno de los más serios problemas que se han presentado es la incidencia de cáncer endometrial debido a efectos secundarios por su actividad estrogénica. Además las pacientes desarrollan resistencia al medicamento, lo que puede conducir a la recurrencia de la neoplasia (Muss *et al.*, 1992). El uso prolongado de TOT está asociado a un aumento en la probabilidad de desarrollar cáncer de útero o hueso (Carthew *et al.*, 2000). Estudios realizados en células tumorales sugieren que la refractariedad al tratamiento con TOT o la capacidad de este compuesto para actuar como un agonista de ER en útero y hueso depende de la integridad del dominio AF-1 (Ali *et al.*, 2002; Klinge *et al.*, 2002). Aunque estos resultados fueron obtenidos *in vitro* y están relacionados con el uso de ciertos promotores y dependen del contexto celular en el que han sido estudiados, sugieren que detrás de la respuesta al

tratamiento, existe un fuerte componente genético. También se han presentado casos de problemas cardiovasculares, disturbios oculares, enfermedades hepáticas, hipercalcemia, anemia, leucopena, elevación de triglicéridos, entre otras, relacionados al uso de TOT (Clemons *et al.*, 2002).

Es por todos estos antecedentes que es necesario investigar el mecanismo de acción del ER y el reclutamiento de co-reguladores tanto en el dominio AF-1 y AF-2, para entender su relación con los diversos fármacos administrados como el TOT, ya que aunque han sido de gran ayuda para el tratamiento de las neoplasias, aún presentan efectos adversos.

1.2.5 Mecanismo de acción del Receptor de Estrógenos α

En ausencia de hormona, el receptor es secuestrado por un complejo inhibitor de proteínas, ya sea chaperonas como las proteínas de choque térmico como hsp90 o hsp70, entre otras. La unión del ligando (E_2) en el LBD, induce un cambio conformacional que promueve una homodimerización y una alta afinidad para unirse a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) del DNA. Una vez que el ER α se encuentra unido al DNA, empieza a reclutar una serie de proteínas co-activadoras en la región AF-2 del LBD, como los miembros de la familia p160 (SRC-1, SRC-2, SRC-3), DRIPs, TRAPs, CARMs, CBP/p300, los cuales son complejos remodeladores de la cromatina, y algunos de ellos pueden tener la capacidad de actuar como acetil transferasas de histonas, éstas ayudan a la descondensación de la cromatina y por lo tanto a su apertura, para que pueda actuar la RNA polimerasa junto con todos los factores de inicio de la transcripción (Hall *et al.*, 2001).

Aún se desconoce si estos miembros reclutados en AF-2 también podrían tener contacto con la región AF-1 del ER α , sin embargo, existe evidencia de que esto es posible, ya que esta interacción aparentemente puede estar involucrada en procesos cooperativos entre ambos dominios. Esto es muy importante, ya que la presencia de un co-activador en ambos dominios podría favorecer un sinergismo entre AF-1 y AF-2, además la interacción entre la región N-terminal y C-terminal puede generar una plataforma de reclutamiento de co-activadores mas estable que permita una mejor transcripción.

El reclutamiento de diversos co-activadores en la región AF-1 podría estar mediada por la fosforilación independiente de ligando por las MAPK, además de que ER α podría estar siendo estimulado de manera independiente de ligando por la ciclina D1, ya que

ésta tiene interacción con miembros de la familia p160, por lo que funge como un puente entre la región AF-1 del ER α y los diversos co-activadores (Zwijnsen *et al.*, 1998; Zwijnsen *et al.*, 1997).

Componentes del complejo DRIP/TRAP también se han visto que podrían tener la capacidad de interactuar con el dominio AF-1 (Aranda 2001).

Una vez que se atraen los primeros co-reguladores de la transcripción se activa una serie de cascadas de señalizaciones donde se reclutan más factores que promueven o inhiben el inicio de la transcripción de los genes dependientes de estrógenos.

1.3 Co-activadores y Co-represores

La principal función de los co-activadores sobre los receptores nucleares, es incrementar la actividad transcripcional, participando en el reclutamiento y en la estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en el promotor de los genes sensibles a hormona (Beato *et al.*, 1996; Bagchi *et al.*, 1992). Por otro lado, la función de los co-represores es evitar la transcripción de los genes blanco, la unión de los co-represores al receptor es facilitada por la presencia de antagonistas.

1.3.1 Miembros de la familia p160

Se han descrito a los miembros de la familia p160 como co-activadores de receptores esteroides (SRC, por sus siglas en inglés “Steroid Receptor Coactivators”) y consisten en tres miembros estrechamente relacionados.

- ✓ SRC-1, también llamado NCoA-1, fue el primer miembro de la familia identificado como una proteína que interacciona con la región AF-2 (Oñate *et al.*, 1995).
- ✓ GRP-1 de ratón identificado por medio de ensayos de doble híbrido y su ortólogo en humano TIF-2 (factor 2 intermediario de la transcripción), constituyen la clase II de la familia de p160, llamados SRC-2 (Hong *et al.*, 1997; Voegel *et al.*, 1996).
- ✓ La clase III de la familia p160 (SRC-3) fue clonada independientemente por varios grupos y son nombrados como p/CIP, RAC3, ACTR, TRAM-1 o AIB-1 (Torchia *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Takeshita *et al.*, 1997; Anzick *et al.*, 1997).

Los miembros de la familia p160 no tienen la capacidad para unirse directamente al DNA, pero son reclutados por los receptores hormonales nucleares a través de contactos proteína-proteína hacia las regiones promotoras de los genes sensibles a hormona, esta unión la realizan de manera dependiente de ligando, posicionándose en la región AF-2 del receptor.

Los miembros de esta familia interactúan de manera muy específica con los receptores nucleares únicamente, no se ha detectado una asociación funcional con otros factores de transcripción en eucariotes. Sin embargo, se ha observado que SRC-1 aumenta la actividad transcripcional de SP-1, GAL-4, AP-1, SRF y NFκB de forma muy débil (Xu *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1999; McKenna *et al.*, 1999).

En el caso de ER y PR, la presencia de antagonistas esteroides que inactiven la función de AF-2, no permite la unión de los co-activadores p160, lo que indica que p160 es requerido para la función de AF-2.

Una sobreexpresión de SRCs en células de mamífero correlaciona con un aumento en la actividad de la transcripción dependiente de ligando, en diferentes tipos de receptores nucleares (Edwards *et al.*, 2000).

Al realizar deleciones homocigotas en el gen de *SRC-1*, algunos autores se dieron cuenta que mostraba una resistencia parcial a diferentes hormonas como estrógeno, progesterona, andrógeno y hormona tiroidea (Xu *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1999). Otros estudios donde se tienen mutantes nulas de SRC-1 en ratas hembras, observan una considerable reducción en el desarrollo de la glándula mamaria y del útero en respuesta a estrógenos y progesterona, y los machos muestran reducción en el crecimiento y desarrollo de la próstata y de los testículos, en respuesta a andrógenos. Por otro lado, estudios con ratones SRC-1^{-/-} demostraron que éstos son viables y fértiles, y además que expresan SRC-2, lo que sugiere que los miembros de la familia p160 pueden tener funciones redundantes (Xu *et al.*, 1998).

A pesar de que los miembros SRC solamente comparten un 40% de homología en su secuencia, son proteínas modulares con regiones conservadas.

La región más conservada es el N-terminal el cual contiene un motivo básico hélice-asa-hélice (bHLH) y un dominio PAS (por sus siglas en inglés period protein self association domain). El bHLH es un motivo de unión a DNA presente en gran variedad de familias de factores de transcripción en eucariotes, y el dominio PAS funciona como un dominio de dimerización, además es el sitio de unión con otras proteínas o para la formación de complejos homo y hetero-diméricos entre los miembros de la familia

SRC. Ambos dominios son necesarios para la unión con los receptores nucleares y para su función de co-activación (Xu *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1999; McKenna *et al.*, 1999).

En la región central de las tres clases de SRCs se localiza el dominio de interacción con los receptores nucleares (NID), el cual contiene tres motivos conservados LXXLL (donde X puede ser cualquier aminoácido), también llamado caja del receptor nuclear (NR), responsable del reconocimiento de AF-2 (Heery *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1998; Voegel *et al.*, 1998; McInerney *et al.*, 1998).

Por lo tanto, la habilidad de p160 de aumentar la actividad transcripcional de los receptores nucleares involucra la interacción de la caja NR con el LBD. Los tres miembros de la familia p160 contienen por lo menos dos dominios autónomos de activación transcripcional (AD1 y AD2). El NID por sí sólo puede unir eficientemente a la proteína al receptor nuclear, pero no puede mediar la activación transcripcional del receptor, mientras que AD1 y AD2 no pueden unirse al receptor pero son capaces de mediar la transcripción, por lo tanto, para que algún miembro SRC pueda unirse al receptor y aumentar la actividad transcripcional de éste, es necesario tanto el NID como los dos dominios AD1 y AD2.

La actividad del dominio AD1 coincide con el sitio de unión de otro co-activador transcripcional llamado proteína de unión a CREB (CBP) y su proteína estrechamente relacionada p300 (Ding *et al.*, 1998; McInerney *et al.*, 1998; Kalhoven *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999), lo que sugiere que CBP/p300 es un blanco de co-activadores de la familia p160 que media la actividad de AD1. Otra proteína llamada co-activador asociado a metil-transferasa de arginina (CARM1) también interacciona con AD1 en los tres miembros de p160 (Chen *et al.*, 1999), además la sobreexpresión de esta proteína aumenta la actividad transcripcional de AD2 (Figura 5).

SRC-1 y SRC-3 poseen la actividad enzimática de acetil-transferasa de histonas (HAT), sin embargo, SRC-2 no tiene esta capacidad.

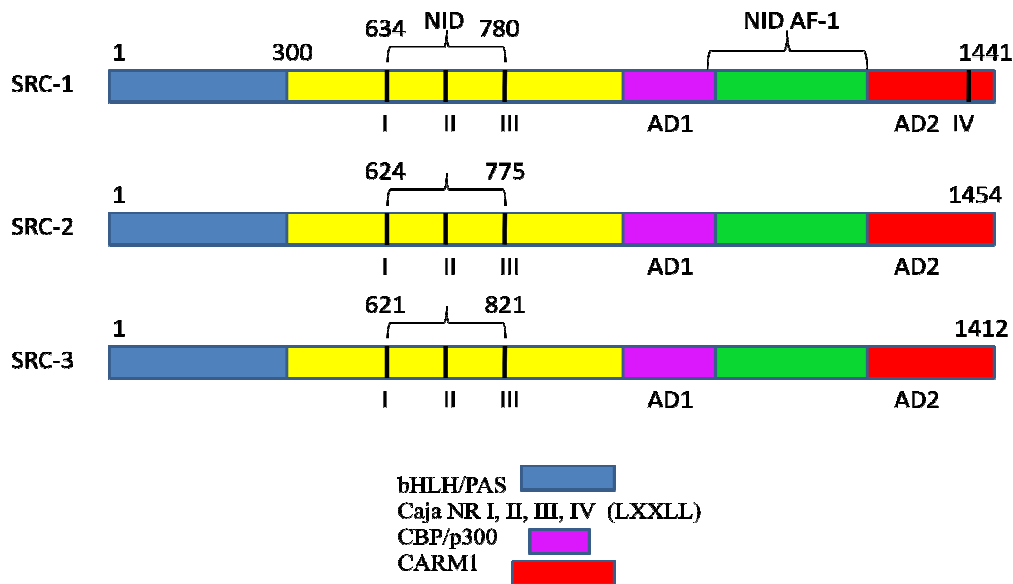


Figura 5. Miembros de la familia p160. SRC-1,2 y 3 Co-activadores del Receptor Esteroide 1, 2 y 3; NID Dominio de interacción con los Receptores Nucleares; AD1 y 2 Dominio autónomo de activación transcripcional 1 y 2; AF-1 Función de activación 1; bHLH/PAS Motivo básico hélice asa hélice; NR Receptor Nuclear; CBP/p300 Proteína de unión a CREB; CARM1 Co-activador asociado a metil transferasa de arginina. (Basado del esquema de Dean *et al.*, 2000).

1.3.2 CBP/p300

CBP y su parálogo p300 están presentes en gran cantidad de organismos multicelulares pero no en levaduras. CBP/p300 se expresan de manera ubicua durante el desarrollo del ratón. Haciendo una comparación de la secuencia peptídica de estas proteínas entre diferentes especies, algunos investigadores demostraron la presencia de numerosas regiones con un alto grado de similitud, entre las que se incluyen tres dominios peptídicos ricos en residuos de cisteínas-histidinas (CH1, CH2, CH3), el sitio de unión para el factor de transcripción CREB, llamado dominio KIX, un bromodominio, el dominio HAT y el dominio co-activador de interacción con receptores esteroideos 1 (SID) (Kalkhoven *et al.*, 2004) (Figura 6).

CBP/p300 puede interactuar con factores de transcripción basal, como la proteína de unión a la caja TATA (TBP), con TFIIB y además forma complejos con la RNA polimerasa II. Estas interacciones ocurren a través de las regiones N y C terminales del dominio de activación, de esta forma CBP/p300 actúa como un puente que estabiliza los complejos de transcripción. CBP/p300 también puede tener interacción con gran

cantidad de factores de transcripción y con otras proteínas a través de sus dominios CH1, CH3, KIX y SID.

Otro aspecto muy importante de su función como co-activador es su habilidad para acetilar promotores cercanos a histonas nucleosomales, resultando en un aumento para la accesibilidad de otros reguladores al DNA (Ogryzko *et al.*, 1996; Bannister *et al.*, 1996; Kundu *et al.*, 2000).

Alteraciones en el gen de CBP/p300 e inactivación funcional de la proteína resultan en gran cantidad de enfermedades en humanos (Giles *et al.*, 1998; Klochendler *et al.*, 2001; Timmermann *et al.*, 2001; Cairns *et al.*, 2001), por ejemplo, traslocación cromosomal *de novo*, microdeleciones y mutaciones puntuales en algunas de las copias del gen de *CBP* resulta en un trastorno de desarrollo congénito, llamado RTS (Síndrome Rubinstein Taybi), esta enfermedad está caracterizada por retraso en el crecimiento y en las funciones mentales, entre otros síntomas (Rubinstein *et al.*, 1963), además de incrementar el riesgo de padecer cáncer.

Otra enfermedad ocasionada por traslocaciones cromosómicas en heterocigotos del gen de CBP o p300 es la anemia mielocítica aguda (AML) (Yang *et al.*, 2004).

Pero sobre todo estas proteínas han sido estrechamente relacionadas con cáncer (Kalkhoven *et al.*, 2004).



Figura 6. Estructura de la familia CBP/p300. AD Dominio autónomo de activación transcripcional; CH1 y CH3 Regiones ricas en residuos de cisteínas histidinas; KIX Sitio de unión para el factor de transcripción CREB; BD Dominio de unión; HAT Acetil transferasa de histona; SID Dominio co-activador de interacción con Receptores Esteroides (Basado del esquema de Kalkhoven *et al.*, 2004).

1.3.3 Otras proteínas co-activadoras

Existen gran variedad de proteínas co-reguladoras que aumentan la actividad transcripcional de los receptores hormonales nucleares, sin embargo, solamente mencionaré algunas de ellas.

La proteína CARM1, como ya se comentó anteriormente, es un co-regulador positivo de los RHN, interacciona con el dominio AD1 de la familia p160, su sobreexpresión en células transfectadas aumenta la actividad transcripcional del dominio AD2, cuando se une al DBD de GAL4, además aumenta la actividad transcripcional de diferentes receptores nucleares, pero sólo cuando p160 co-expresa. CARM1 también tiene la capacidad de metilar los residuos 2, 17 y 26 de arginina de la histona H3 (Ma *et al.*, 1999).

Las proteínas DRIPs (proteínas que interactúan con la vitamina D) y las proteínas TRAPs (proteínas asociadas al receptor tiroideo), son grandes complejos que contienen alrededor de 14 proteínas, las cuales interactúan con la región AF-2 dependiente de ligando, éstos co-activadores también contienen el motivo LXXLL que reconoce AF-2 como los miembros de la familia p160.

Algunos miembros de estos complejos se ha visto que tienen interacción con la RNA polimerasa II o con factores del inicio de la transcripción, por lo que se sugiere que podrían ser parte de complejos remodeladores de la cromatina (Dean *et al.*, 2000).

Estas proteínas son selectivos para algunos receptores, ya que las DRIPs no interactúan con ER, pero sí con otros factores de transcripción (Freedman *et al.*, 1999).

Otro co-activador del AR es la proteína ARA70, la cual interacciona con LBD de AR de manera dependiente de ligando, sin embargo la proteína ARA24 interacciona con el N-terminal de AR.

1.3.4 Co-represores

La unión de antagonistas esteroideos al ER α promueve una interacción no productiva del receptor con el DNA blanco, como resultado de un cambio conformacional inducido por el antagonista, en la región C-terminal del receptor sobre la región AF-2.

Análisis cristalográficos del LBD del ER muestran que la hélice 12 de AF-2 se posiciona de manera diferente cuando se une tamoxifén, a diferencia de cuando se forma un complejo con agonistas; cuando se une un antagonista, la superficie hidrofóbica de la hélice 12, forma una interacción intramolecular con AF-2 que impide la unión de los co-activadores.

La imposibilidad de los co-activadores de unirse al receptor no solamente depende de los antagonistas, varios grupos han descubierto que la unión de los co-represores

también influye para evitar la actividad transcripcional del receptor. Algunos de estos co-represores son las proteínas NCoR (co-represor del receptor nuclear) y SMRT (mediador del silenciamiento de los receptores retinóico y tiroideo) (Smith *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1998). Estas dos proteínas existen en un complejo con los homólogos de mamífero del co-represor de levadura Sin3 y con deacetilasas de histona en levadura (HDAC).

La función co-represora de NCoR/SMRT es dependiente de la asociación con Sin3/HDAC, lo que indica que la desacetilación de las histonas se lleva a cabo de manera conjunta con la actividad de silenciamiento de estas proteínas. Por lo tanto, tanto NCoR como SMRT tienen una influencia opuesta sobre la estructura de la cromatina que las HATs, ya que impiden el acceso de los factores de transcripción al DNA (Wolffe *et al.*, 1997). En ausencia de ligando o cuando se encuentra unido un agonista, el receptor no interactúa con ningún co-represor, la interacción de NCoR/SMRT con los receptores esteroides ocurre como resultado de un cambio conformacional inducido por ligandos sintéticos (antagonistas). Bajo condiciones donde el TOT lleva a cabo una actividad parcial agonista/antagonista, la sobreexpresión de NCoR/SMRT inhibe parcialmente la actividad agonista del TOT (Smith *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1998).

Una nueva proteína de 37 kDa se descubrió hace algunos años por reprimir de manera selectiva transcripcionalmente al ER, llamada, represor de la actividad del receptor de estrógenos (REA), esta proteína interactúa preferentemente con el complejo antiestrogénico-ER y potencializa la activación inhibitoria (Montano *et al.*, 1999).

Experimentos con modelos murinos, demuestran que los niveles de NCoR disminuyen en tumores resistentes a TOT, lo que sugiere que la reducción de los niveles del co-represor permite que el TOT estimule al ER a través de la región AF-1 (Lavinsky *et al.*, 1998).

1.3.5 La región AF-1 y AF-2 de ER α y su interacción con co-activadores y co-represores

La región AF-1 del ER α puede actuar de manera independiente o sinérgicamente con AF-2 para promover una mejor activación de la transcripción, aunque no ha sido bien establecido cómo los dos factores interactúan con los mismos o con diferentes co-activadores.

La RNA helicasa p68 ha sido recientemente identificada por unirse *in vitro* e *in vivo* a la región AF-1 del ER α , sin presentar ningún contacto con AF-2 (Endoh *et al.*, 1999), la sobreexpresión de p68 aumenta la actividad de AF-1, sin mostrar ningún efecto sobre AF-2, este efecto parece ser dependiente de la fosforilación de la Ser-118, lo que sugiere que p68 podría ser un blanco para mediar la fosforilación de AF-1.

A pesar de que los miembros p160 han sido originalmente identificados como co-activadores de AF-2, hay gran evidencia de que podrían estar interaccionando y aumentando la actividad de AF-1 (Ma *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 1998; Alen *et al.*, 1999), de hecho, la interacción de p160 con AF-1 del ER α y del PR es considerablemente más débil que con AF-2. Por su parte, la interacción de AF-1 con miembros p160, se lleva a cabo hacia la región C-terminal entre los dominios AD1 y AD2 (Figura 4), este sitio ha sido nombrado dominio AF-1 de interacción con el receptor nuclear (NIDAF-1) (Ma *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 1998). Experimentos donde se llevan a cabo deleciones en la caja NR observan que aumenta la actividad de AF-1, pero no la de AF-2, en cambio deleciones en NIDAF-1 inhiben la actividad de AF-1, y aumentan la actividad de AF-2; estos resultados indican que tanto AF-1 como AF-2 se unen simultáneamente con al menos dos regiones de la misma proteína p160, es decir existe una estrecha relación entre el N-terminal y el C-terminal del receptor que permita la unión de un solo péptido en ambas regiones (Figura 7).

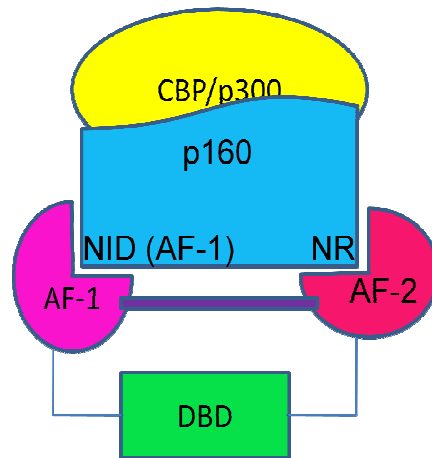


Figura 7. Estructura sinérgica entre la región AF-1 y AF-2 y la unión de co-activadores. CBP/p300 Proteína de unión a CREB; NID Dominio de interacción con los Receptores Nucleares; AF- 1 y 2 Función de Activación 1 y 2; NR Receptor Nuclear; DBD Dominio de unión a DNA; p160 Proteína de 160 kDa (Basado del esquema de Dean *et al.*, 2000).

Es por esto que en el laboratorio del Dr. Alfonso León del Río se planteó la hipótesis de que la región AF-1 del ER podría funcionar como un puerto de anclaje para el reclutamiento de complejos multipéptidicos a la región promotora de genes activados por estrógeno, de manera similar a la descrita para el dominio AF-2. Para ello se realizaron experimentos de doble híbrido en levadura, donde se encontraron una serie de factores nombrados ERAP-1-6, los cuales tienen interacción con la región AF-1 del ER α , uno de ellos es la proteína IFI27 (mas adelante explicaré con más detalle estos resultados).

1.4 Proteína inducida por interferón α (IFI27)

Uno de los factores que fueron descubiertos en nuestro laboratorio, por medio de la técnica de doble híbrido en levadura y que se une a la región AF-1 de ER α , es la proteína IFI27, p27 o ISG12 (proteína inducida por interferón α).

El gen tiene un marco de lectura abierto el cual codifica para una proteína de 122 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 11,528 kDa. El codón de inicio (55-57 nucleótidos) tiene una secuencia consenso típica en eucariotes (Kozak *et al.*, 1987), y una señal de poliadenilación 21 nucleótidos río arriba del inicio de la cola de poli-A.

Esta proteína es altamente hidrofóbica, y por lo tanto se localiza en la membrana externa nuclear (Martensen *et al.*, 2001) sin embargo, no tiene un péptido señal hacia la región N-terminal que lo direccionalice hacia algún compartimento celular específico (Rasmussen *et al.*, 1993).

El gen *p27* se localiza en la banda 14q32 del genoma humano, región que es frecuentemente involucrada en traslocaciones cromosómicas, asociado con linfomas malignos (Russo *et al.*, 1989; Mitelman *et al.*, 1991). IFI27 tiene un alto grado de similitud (33 %) con una proteína que es inducida por interferón α (IFN α), llamada proteína 6-16, por lo tanto, IFI27 es estimulada tanto por interferón como por estradiol, dependiendo del tipo celular, sin embargo, a pesar de que la expresión de *p27* es inducida por estradiol en células de cáncer de mama MCF7, no es dependiente de ER en otras líneas celulares, ya que altos niveles del transcrito de *p27* fueron detectados tanto en líneas celulares negativas al receptor de estrógenos, como en carcinomas de glándula mamaria ER negativas (Rasmussen *et al.*, 1993).

Los interferones, los cuales son una clase de citocinas, forman parte de las defensas naturales del cuerpo en respuesta a infecciones virales, bacterianas, parasitarias y sobre

todo a tumores, y se ha sugerido que los genes IFN α/β representan una clase de genes supresores de tumores (Cowan *et al.*, 1988; Díaz *et al.*, 1988; Pitha *et al.*, 1990; James *et al.*, 1991), éstos llevan a cabo su efecto antitumoral afectando funcionalmente al sistema inmune o directamente sobre las células tumorales. Se cree que los IFNs median estos efectos por medio de la inducción o la represión de múltiples proteínas, llamadas ISGs (genes inducidos por interferón) (Pestka *et al.*, 1987; Kerr *et al.*, 1991; Sen *et al.*, 1992) e IFI27 es una de ellas, aunque sus efectos antitumorales aún no han sido descritos.

Por otro lado, el incremento en la expresión del gen de *p27* se detecta solamente en algunos tumores de glándula mamaria, lo que indicaría que en estos tumores se producen altos niveles o son sensibles a IFN α/β (Rasmussen *et al.*, 1993), diversos estudios han demostrado altos niveles de mRNA de *p27* en tumores de cáncer de mama, colon, estómago y pulmón. Además se ha utilizado a IFI27 como marcador tumoral.

Estudios realizados donde administran conjuntamente IFN α y TOT a un modelo de ratones con cáncer de mama, observan que existe una inhibición sinérgica en el crecimiento de la glándula mamaria, esto hace pensar que el tamoxifén podría estar aumentando la actividad antitumoral del IFN α a través del aumento en la expresión de ISGs (Lindner *et al.*, 1997).

Inclusive, el IFN α por sí solo es capaz de inducir la expresión de ISGs en células ER negativas.

Estos antecedentes generan controversia sobre el efecto de IFI27 sobre células de cáncer de mama, ya que al ser estimulado por IFN, podría actuar como un gen supresor de tumores, pero por otro lado, si es estimulado por estradiol, entonces su función sería activando la transcripción de genes sensibles a hormona a través de su unión con ER.

HIPÓTESIS

El dominio AF-1 del ER α funciona como un puerto de anclaje para el reclutamiento de complejos multipéptidos a la región promotora de genes activados por estrógenos, de manera similar a la descrita para el dominio AF-2. La proteína IFI27 podría actuar como mediador del sinergismo observado entre las regiones AF-1 y AF-2 en la activación transcripcional mediada por estrógenos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel funcional de IFI27 sobre la regulación a nivel transcripcional del ER α .

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar a la proteína IFI27 en el vector pcDNA3.1+
- Determinar la presencia de IFI27 en el interior del núcleo y su colocalización con el ER α , al estimular con estradiol.
- Caracterizar funcionalmente a la proteína IFI27 sobre la actividad transcripcional del ER α .

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Clonación de factores nucleares que interaccionan directamente con la región AF-1 de ER α humano por el método de doble híbrido

Para poner a prueba la hipótesis, en el laboratorio del Dr. Alfonso León del Río se decidió utilizar al dominio AF-1 del receptor de estrógenos como una carnada molecular para identificar, a partir de una biblioteca genética humana, a genes cuyos productos modificarían la actividad de ER a través de su unión con el dominio AF-1.

Con la finalidad de clonar a estas proteínas, se decidió utilizar al sistema de doble híbrido en levadura (Y2H) (Matchmaker two-hybrid system 2 Clontech Laboratorios, Inc), el cual permite identificar interacciones proteína-proteína en un sistema *in vivo* como *Saccharomyces cerevisiae*.

El sistema utiliza un fragmento de una proteína conocida, unida al dominio de unión a DNA de la proteína GAL4 (aa 1-147) de *S. cerevisiae* como carnada para “atrapar” proteínas que interactúen con ella. Con esta proteína carnada se tamiza una genoteca de cDNA fusionada al dominio de trans-activación de GAL4 (aa 768-881). Una interacción positiva entre la carnada (AF-1) y proteínas de la genoteca, restaurará la integridad del factor GAL4, activando los genes reporteros His3 y LacZ que se encuentran bajo el control de elementos de respuesta de GAL4 (Figura 8). Este sistema se basa en una doble selección, en aquellas levaduras donde AF-1 se asocia a algunas proteínas de la genoteca humana, la activación de GAL4 permitirá a estas células sobrevivir en medios de cultivo que carezcan de los aminoácidos leucina y triptofano. Las colonias resultantes son transferidas a un filtro de nitrocelulosa para llevar a cabo el ensayo de la actividad de β -galactosidasa, otro gen reportero activado por la unión de AF-1 y proteínas de la genoteca. La doble selección minimiza las posibilidades de obtener falsos positivos y permite la identificación de interacciones específicas entre proteínas desconocidas.

Para asegurar que todos los genes humanos estuvieran representados en el experimento se realizaron dos tamizajes secuenciales con tres millones de clonas cada uno (3×10^6 clonas). Al sembrar las células de levadura en medio restrictivo sin leucina se obtuvieron 102 colonias, de las cuales sólo 48 dieron positivo para la actividad de β -galactosidasa. Los plásmidos que codifican a estas proteínas fueron aislados y las secuencias de DNA mostraron que las 48 colonias representaban diferentes fragmentos de 6 genes distintos que no han sido previamente caracterizados en la base de datos del NCBI y a las cuales se denominó Estrogen Receptor Associated Proteins (ERAP-1-6). Entre ellos se encuentra la proteína IFI27, cuya función sobre el ER α es aún desconocida.

4.2 Clonación de la proteína IFI27 en el vector pcDNA 3.1(+)

Para poder conocer la función de IFI27 sobre la actividad de ER α es necesario realizar transfecciones transitorias en células humanas, para ello es indispensable tener a cada uno de los genes clonados en algún vector. El vector que se utilizó para clonar al gen de la proteína IFI27 fue el vector pcDNA 3.1(+) (Figura 8), el cual es un vector de expresión de mamíferos derivado del vector de expresión pcDNA3, contiene el promotor CMV y un gen resistente a neomicina y ampicilina, este vector permite obtener altos niveles de expresión en transfecciones estables y transitorias de células de mamífero.

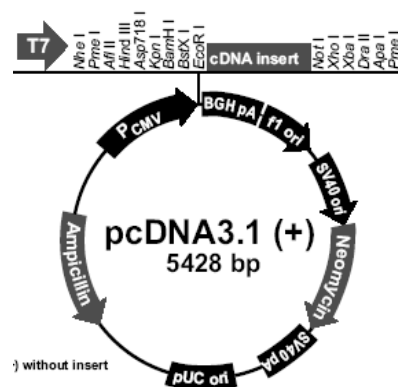


Figura 8. Vector pcDNA3.1(+) Invitrogen. Vector de 5.4 kb derivado del vector pcDNA 3, diseñado para obtener alto niveles de expresión en transfecciones estables y transitorias en células de mamífero. Contiene el P_{CMV} Promotor del citomegalovirus humano; un sitio múltiple de clonación con orientación “forward” y “reverse” para

facilitar la clonación y un gen de resistencia a neomicina para la selección de líneas celulares estables.

Los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar por PCR al cDNA que codifica a IFI27 entre los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* fueron los siguientes:

“FORWARD”: 5' **AAGAATTC**CATGGAGGCCTCTGCTCTCACC 3'

“REVERSE”: 5' AACT**CGAG**GCTAGTAGAACCTCGCAATGAC 3'

El tamaño del producto de PCR esperado es de 366 pb.

Nota: El oligonucleótido “forward” tiene el sitio de restricción EcoRI (negritas y subrayado), mientras que el oligonucleótido “reverse” incluye el sitio de restricción XhoI (negritas y subrayado).

El protocolo es el siguiente:

1.- Cuantificación de RNA.

- Hacer una dilución del RNA (1 ml agua dd + 1 µl RNA).
- Leer la absorbancia a 260 nm.
- Calcular la concentración del RNA, multiplicando la absorbancia por un factor de 40, el resultado tendrá las unidades en µg/µl.

2.- RT-PCR.

- Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen (µl)
RNA (5µg)	1.2
Oligo dT	1
dnTP's (10nM)	1
Agua	8.8

- Incubar 5 min. a 65°C.
- Enfriar en hielo y agregar:

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 5x first-trand	4
DTT (0.1M)	2
Inhibidor de RNasas	1

- c) Mezclar e incubar a 42°C por 2 min.
- d) Agregar 2 µl de la enzima SuperScript II (transcriptasa reversa).
- e) Incubar a 42°C por 50min.
- f) Inactivar a la enzima, incubando a 70°C por 15 min.
- g) Agregar 1 µl de RNasa H.
- h) Incubar a 37°C por 20 min.
- i) Conservar la muestra a 4°C.

3.- PCR.

- a) Preparar la siguiente mezcla de reacción.

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de PCR 10X	5
MgCl ₂ (50mM)	1.5
“Primer forward” (10 nM)	5
“Primer reverse” (10nM)	5
dnTP’s (10nM)	1
Taq polimerasa	0.5
cDNA	2
Agua	30

Bajo las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial del DNA	94	4
Amplificación 40 ciclos		
Desnaturalización del DNA	94	0.5
Unión de oligonucleótidos al molde	58	0.5
Síntesis	72	0.5
Síntesis final	72	10

- a) Fraccionar electroforéticamente en un gel de agarosa una alícuota del producto de PCR para corroborar la amplificación del fragmento.
- b) Precipitar el producto de PCR (Ver material y métodos precipitación de DNA).
- c) Reacción de digestión del vector pcDNA 3.1(+) para generar los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* donde se clonará a IFI27. Para ello se preparó la siguiente mezcla de reacción y se dejó incubando a 37°C toda la noche (O/N).

Reactivo	Volumen (μ l)
DNA (4 ng/ μ l)	8
Buffer 10X	1.5
BSA 10X	1.5
Enzima <i>EcoRI</i> (10 u/ μ l)	0.2
Enzima <i>XhoI</i> (10 u/ μ l)	0.2
Agua	3.6
Volumen final	15

- d) Precipitar la reacción de digestión del vector.
- e) Verificar por electroforesis en gel de agarosa las concentraciones tanto del vector como la del fragmento de IFI27.
- f) Reacción de ligación de IFI27 al vector pcDNA 3.1(+). La mezcla de reacción fue la siguiente, ésta se dejó incubando a 4°C O/N.

Reactivo	Volumen (μ l)
DNA	4
Vector (40 ng)	0.26
Enzima ligasa (3 u/ μ l)	1
Buffer de ligación 5X	2
Agua	2.74
Volumen final de la reacción	10

- g) Transformar células XL1-Blue por choque térmico con la reacción de ligación (Ver material y métodos transformación por choque térmico).
- h) Crecer las colonias transformantes en medio LB con ampicilina (Amp). Dejar incubando O/N a 37°C con agitación constante.
- i) Hacer extracción del plásmido a pequeña escala (minipreparaciones) (Ver material y métodos minipreps).
- j) Cortar el plásmido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, separar en un gel de agarosa y verificar que se libere un inserto del tamaño esperado (366 pb).
- k) Ya que se corroboró que alguna clona es positiva, es decir que contiene el fragmento de IFI27, entonces se hacen maxipreparaciones, extracción del plásmido a gran escala (Ver material y métodos maxipreps).

Los demás genes necesarios para las transfecciones transitorias (ER, ERE y β -gal), ya se encontraban clonados, así que, como parte de esta tesis, lo que se realizó fue la extracción del plásmido a gran escala (maxipreps), lo mismo para cada uno de los co-activadores hasta el momento ya conocidos que se unen a la región AF-2, como SRC-1, CBP/p300 y los clonados en el laboratorio como ERAP-1, uno de los factores ERAP que se encontraron por medio del doble híbrido y que interacciona con la región AF-1 de ER α ; así como algunos co-represores como NCoR y SMRT.

4.3 Cultivos celulares

- 1.- Descongelar de nitrógeno líquido células de hepatoblastoma humano (HepG2) (American Type-Cell Collection) y transferirlas a cajas petri de 15 cm de diámetro en una campana de flujo laminar previamente tratada con luz UV.
 - 2.- Mantenerlas en 20 ml de medio α -MEM (GIBCO) suplementado con 10 % de FBS (HyClone) y penicilina/estreptomicina (GIBCO) a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.
 - 3.- Determinar la ausencia de contaminación por bacterias y hongos, así como la confluencia de las células, observando diariamente las células al microscopio.
 - 4.- Reemplazar el medio cada tercer día, lavando las células con PBS (GIBCO) dos veces y mantenerlas en medio α -MEM.
 - 5.- Dividir a las células una vez que lleguen a una confluencia del 80%.
- a) Lavar a las células con PBS/EDTA (GIBCO) para facilitar su desprendimiento.
 - b) Agregar 2 ml de Tripsina/EDTA 10 X (GIBCO).
 - c) Incubar a 37°C por 5 min con 5 % de CO₂ para despegar a la mayoría de las células de la superficie.
 - d) Resuspender las células en el medio de cultivo varias veces para disgregarlas perfectamente, evitando la formación de grumos.
 - e) Mantenerlas en medio de cultivo bajo las condiciones antes mencionadas.

4.4 Transfecciones transitorias

La expresión de las proteínas IFI27, ER α , luciferasa, β -galactosidasa, SRC-1 y ERAP-1 en células HepG2, se realizó mediante ensayos de transfección transitoria, los cuales consisten en la inserción de plásmidos que contienen el cDNA que codifica para cada una de estas proteínas a células eucariotes, en donde el DNA insertado, no es incorporado al material genético de la célula, sino simplemente es expresado transitoriamente.

El proceso mediante el cual el DNA es introducido a la célula, es a través de la formación de cristales de fosfato de calcio, una solución salina de buffer HEPES (HeBS) que presenta iones fosfato, se mezcla con una solución de cloruro de calcio, la cual contiene al DNA que será introducido, una vez mezcladas ambas soluciones, se forma un precipitado de fosfato de calcio, el cual lleva en su superficie el DNA que será transfectado, éste precipitado se introduce a las células junto con el DNA.

El protocolo es el siguiente:

- 1.- Lavar a las células con PBS/EDTA dos veces.
- 2.- Agregar 2 ml de tripsina e incubar 5 min. a 37°C con 5% de CO₂.
- 3.- Colectar las células y resuspenderlas para disgregar y sea más fácil su conteo.
- 4.- Tomar 200 µl de células y pasarlas a un tubo eppendorf.
- 5.- De los 200 µl tomar 90 µl y agregarles 10 µl de azul de tripano (colorante que tiñe de azul a las células muertas).
- 6.- Tomar 10 µl de la mezcla y colocarlos en la Cámara de Newbawer, contar el número de células vivas.
- 7.- Hacer el cálculo para sembrar 500,000 células en cada pozo.
- 8.- Sembrar las 500,000 células en cada pozo de 6 wells en medio Alpha MEM e incubar bajo las mismas condiciones.
- 9.- Al día siguiente, cambiar el medio a las células.
- 10.- En tubos falcon preparar la siguiente mezcla de reacción en el orden indicado:
 - a) Agua
 - b) DNA y vortexear.
 - c) CaCl₂ agregar gota a gota sin mezclar.
 - d) Buffer 2X primero agregar 3 gotas y lo restante con agitación continua.
 - e) Vortexear por 20 seg.
 - f) Incubar por 20 min. a TA.
 - g) Agregar la mezcla a cada pozo (260 µl).
 - h) Incubar por 4 hrs. a 37°C.
 - i) Lavar con PBS para eliminar el exceso de cristales de fosfato de calcio, ya que éste puede provocar toxicidad a las células después de un largo tiempo de exposición.
 - j) Estimular con estradiol a una concentración final de 1 µM para cada pozo.
 - k) Incubar O/N a 37°C con 5% de CO₂.

4.5 Ensayo de Luciferasa y β-galactosidasa

La luciferasa es una enzima comúnmente utilizada por emitir bioluminiscencia, ya que cataliza la oxidación de sus sustrato (luciferina), produciendo gran cantidad de energía, ésta energía es transformada en luz casi en su totalidad, la cual es captada por un luminómetro.

La luciferasa es utilizada como una proteína reportera, capaz de medir la actividad transcripcional de ERα al estar unida a tres secuencias palindrómicas de ERE, las cuales son reconocidas por el receptor para activar la transcripción.

La proteína sintetizada es capaz de catalizar la oxidación de la luciferina y emitir la luz, la cual, es proporcional a la proteína producida.

La β -galactosidasa es una enzima que digiere a la lactosa en glucosa y galactosa, una vez que se une a su sustrato, produce un compuesto de color capaz de normalizar los datos obtenidos de la actividad de la luciferasa, ya que de esta forma se puede determinar la eficiencia de la transfección.

Para llevar a cabo estos ensayos el protocolo es el siguiente:

- 1.- Eliminar el medio a las células.
- 2.- Lavarlas con PBS 1X dos veces.
- 3.- Agregar 200 μ l de buffer de lisis a cada pozo.
- 4.- Incubar por 20 min. a 4°C.
- 5.- Recuperar las células y colocarlas en tubos eppendorf.
- 6.- Centrifugar las células 30 seg. a máxima velocidad.

a) Ensayo de β -galactosidasa:

- 1.- Agregar 20 μ l del sobrenadante de las células a un tubo para luminómetro.
- 2.- Agregar 100 μ l de buffer RX (β -gal mas galactón).
- 3.- Incubar 1 hr a TA.
- 4.- Agregar 100 μ l de acelerador.
- 5.- Mezclar y leer.

b) Ensayo de luciferasa:

- 1.- Agregar 25 μ l de la solución KTME más DTT a un tubo para luminómetro.
- 2.- Agregar 100 μ l del sobrenadante de las células.
- 3.- Agregar 100 μ l de la mezcla de reacción (KTME, DTT, ATP y Luciferina).
- 4.- Mezclar y leer.

4.6 Análisis estadístico de las transfecciones transitorias

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, los resultados de la lectura de la luciferasa fueron normalizados con los valores obtenidos del ensayo de β -galactosidasa y expresados en actividad de luciferasa. Los ensayos fueron realizados con sus controles sin estímulo de estradiol, para poder comparar entre un efecto con E_2 y sin E_2 . Cada experimento tiene un valor de desviación estándar.

4.7 Análisis del anticuerpo comercial de IFI27

Para corroborar que el anticuerpo comercial de IFI27 (Abnova) reconociera a la proteína en extractos celulares de células HepG2 y células de adenocarcinoma de glándula mamaria (MCF7), se realizaron ensayos de Western Blot.

1.- Obtención de extractos totales.

- a) Lavar con PBS 1X una caja de 15 cm de diámetro con células HepG2 y MCF7, para eliminar a las células que se estuvieran despegando.
- b) Tripsinizar a las células por 5 min a 37°C.
- c) Se pasan todas las células resuspendidas a un tubo falcon.
- d) Centrifugar a 3,000 rpm por 8 min.
- e) Lavar con TBS 1X dos veces.
- f) Eliminar el TBS 1X, secar el pellet y conservarlo a -70°C.
- g) Disolver el pellet en PBS1X.

2.- Western blot

- a) Preparar geles de poliacrilamida al 12% (Ver apéndice).
- b) Agregar a la muestra buffer de corrida 5X.
- c) Correr el gel a 100 V por 2 hrs aprox.
- d) Transferirlo a una membrana de PVDF a 150 mA y 100 V por 50 min.
- e) Incubar la membrana en solución de bloqueo O/N a 4°C con agitación suave.
- f) Desechar la solución de bloqueo y agregar el anticuerpo α IFI27 1:1,000 o 1:500, preparado en solución de bloqueo
- g) Incubar a TA por 3 hrs.
- h) Eliminar la solución con el anticuerpo y lavar 4 veces con TBS-T 1X al 0.05% de Tween por 5 min cada lavado.
- i) Agregar el anticuerpo secundario preparado en solución de bloqueo 1:6,000.
- j) Incubar por 1 hr a TA con agitación suave.
- k) Lavar 3 veces 10 min cada uno con PBS-T 1X.

3.- Revelado de la membrana (Se debe realizar en el cuarto oscuro).

- a) Preparar la solución de revelado para quimioluminiscencia (Ver apéndice).
- b) Agregar la solución de revelado a la superficie de la membrana y dejar actuar por 5 min.
- c) Colocar la membrana dentro de un cassette para protegerla de la luz.
- d) Cortar una película del mismo tamaño de la membrana y colocarla encima de ésta.
- e) Incubar por 5 min
- f) Sumergir la membrana en solución de revelado hasta que empiecen a aparecer las bandas.
- g) Sumergir la membrana en agua para eliminar restos de la solución de revelado.
- h) Sumergir la membrana en solución fijadora por 1 min.

4.8 Inmunolocalización

Existen reportes donde inmunolocalizan a la proteína IFI27 en la membrana externa nuclear, sin embargo, no hay estudios hoy en día, donde la detecten dentro del núcleo, para nosotros es muy importante conocer si ésta proteína se internaliza al núcleo, debido a que ahí, es donde podría estar llevando a cabo su función sobre la *trans*-activación

mediada por el receptor de estrógenos. Además de observar su presencia en el interior, también es muy importante ver si colocaliza con el ER.

Tanto su internalización al núcleo, como su colocalización con ER, deben ser mediadas por un estímulo de estradiol.

Para poder observar todos estos cambios de relocalización nuclear, se hicieron experimentos de inmunolocalización con células HepG2 y MCF7, con y sin estímulo de estradiol.

Se utilizaron cuatro anticuerpos, uno contra el ER α , otro contra la proteína IFI27 y los otros dos fueron anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos, el de rodamina (rojo) para detectar al ER α y el otro acoplado a FITC (verde), para detectar a IFI27, además se utilizó al fluoróforo DAPI (azul) para localizar a los núcleos.

El protocolo es el siguiente:

- 1.- Sembrar alrededor de 30 a 50 mil células en platos 6 wells con vidrios de reloj estériles
en su interior, ya a las 4 hrs dar el estímulo de estradiol a las que corresponda.
- 2.- Incubar a 37°C O/N con 5% de CO₂.
- 3.- Lavar 3 veces con 1 ml de PBS 1X.
- 4.- Fijar las células con 500 μ l de paraformaldehído al 3% por 20 min.
- 5.- Lavar 2 veces con 1 ml de PBS 1X.
- 6.- Incubar 5 min con NH₄Cl (50 mM).
- 7.- Lavar con PBS 1X.
- 8.- Permeabilizar las células con 1 ml de PBS-tritón al 0.1 % por 15 min.
- 9.- Bloquear con 1 gota de image T-Fx Signal Enhancer (Invitrogen) o BSA al 3 % por 30 min.
- 10.- Lavar 2 veces con PBS 1X.
- 11.- Agregar 100 μ l de los anticuerpos primarios (ER- 1:300 e IFI27- 1:500).
- 12.- Incubar a 4°C O/N sellados para evitar que se sequen.
- 13.- Lavar 3 veces con PBS 1X.
- 14.- Agregar 200 μ l del anticuerpo secundario (1:1,000 para ambos anticuerpos).
- 15.- Incubar 3 hrs a TA.
- 16.- Lavar 3 veces con PBS 1X.
- 17.- Montar los vidrios de reloj con las células en portaobjetos con una gota de Prolong Gold
Antifade con DAPI (Invitrogen) y sellar con barniz de uñas.
- 18.- Almacenar a 4°C protegidos de la luz.
- 19.- Observar al microscopio de fluorescencia.

4.9 Precipitación de DNA

- 1.- Agregar 50 μ l de AcNH₄ 10 M.
- 2.- Agregar 200 μ l de isopropanol.

- 3.- Agregar 2 μ l de glicógeno.
- 4.- Centrifugar a máx velocidad por 20 min.
- 5.- Resuspender en TE.

4.10 Transformación por choque térmico

- 1.- Descongelar en hielo células competentes XL-1 Blue (tratadas con CaCl_2).
- 2.- Pasar a un tubo 100 μ l de células competentes más toda la reacción de ligación.
- 3.- Incubar en hielo por 30 min.
- 4.- Incubar a 42°C por 50 seg.
- 5.- Incubar 1 min en hielo.
- 6.- Agregar 1 ml de medio LB.
- 7.- Incubar a 37 °C con agitación constante por 1.5 hrs.
- 8.- Centrifugar 1 min a 8,000 rpm.
- 9.- Decantar el sobrenadante.
- 10.- Resuspender en 200 μ l de medio LB.
- 11.- Plaquear en cajas con medio LB más ampicilina.
- 12.- Incubar las cajas a 37°C O/N.

4.11 Minipreparaciones

- 1.- Crecer un cultivo del plásmido en 2 ml de medio LB con ampicilina O/N a 37°C con
agitación constante.
- 2.- Centrifugar a 8,000 rpm por 2 min.
- 3.- Resuspender el pellet en 100 μ l de ETC (Ver apéndice) más 2 μ l de RNasa (10 mg/ml) y
1 μ l de lisozima (200 μ g/ml).
- 4.- Agregar 250 μ l de agua y vortexear.
- 5.- Incubar 10 min a TA.
- 6.- Agregar 300 μ l de la solución I para extracción de plásmidos (Ver apéndice).
- 7.- Agregar 100 μ l de cloroformo y mezclar (No vortexear).
- 8.- Agregar 300 μ l de la solución II para extracción de plásmidos (Ver apéndice),
mezclar
(No vortexear).
- 9.- Centrifugar 2 min a máx velocidad.
- 10.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 11.- Incubar 10 min a 37 °C.
- 12.- Agregar un volumen de etanol al 100%.
- 13.- Centrifugar por 30 min. a máx velocidad a 4°C.
- 14.- Descartar el sobrenadante y lavar 2 veces con etanol al 70%.
- 15.- Descartar el sobrenadante y resuspender en TE.

4.12 Maxipreparaciones

- 1.- Crecer un cultivo del plásmido en 300 ml de medio LB con ampicilina O/N a 37°C con
agitación constante.
- 2.- Resuspender en 8 ml de ETC (Ver apéndice), agregar 25 mg de lisozima.
- 3.- Agregar 3 ml de agua e incubar 10 min a TA.

- 4.- Agregar 10 ml de solución I para extracción de plásmidos (Ver apéndice).
- 5.- Agregar 3 ml de cloroformo y mezclar (No vortexear).
- 6.- Incubar 5 min en hielo.
- 7.- Agregar 5 ml de la solución II para extracción de plásmidos (Ver apéndice), mezclar (No vortexear).
- 8.- Incubar 5 min en hielo.
- 9.- Centrifugar 10 min a 15,000 rpm.
- 10.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 11.- Agregar 13 ml de isopropanol.
- 12.- Incubar 5 min en hielo.
- 13.- Centrifugar 20 min a 15,000 rpm.
- 14.- Descartar el sobrenadante y disolver el pellet en 4 ml de TE.
- 15.- Agregar 2 ml de LiCl 10 M e incubar el hielo 10 min.
- 16.- Centrifugar 10 min a 10,000 rpm.
- 17.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y agregar 4 ml de isopropanol.
- 18.- Incubar en hielo 5 min.
- 19.- Centrifugar 20 min a 15,000 rpm y descartar el sobrenadante.
- 20.- Resuspender el pellet en 2 ml de TE.
- 21.- Agregar 2 gr de CsCl y 100 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml).
- 22.- Centrifugar 10 min a 4,000 rpm.
- 23.- Transferir la mezcla a tubos especiales para ultracentrífuga y sellarlos.
- 24.- Centrifugar a 80,000 rpm O/N a 22 °C.
- 25.- Extraer la banda de DNA plásmídico.
- 26.- Extraer el bromuro de etidio 3 o 4 veces con alícuotas de 1 ml de butanol hasta que desaparezca la coloración rosada.
- 27.- Agregar agua hasta un volumen de 1 ml y transferirlo a tubos corex.
- 28.- Agregar 800 μ l de agua, 1 ml de AcNa 3M pH 5.2 y 6 ml de etanol al 100%.
- 29.- Centrifugar 15 min a 15,000 rpm a 4°C, descartar el sobrenadante.
- 30.- Disolver el pellet en TE.
- 31.- Precipitar el DNA con 40 μ l de AcNa 3M pH 5.2 y 880 μ l de etanol al 100%.
- 32.- Centrifugar 5 min a máx velocidad.
- 33.- Lavar 2 veces con etanol al 70%.
- 34.- Disolver el pellet en TE.

RESULTADOS

5.1 Clonación del cDNA de IFI27

Con el propósito de caracterizar funcionalmente a la proteína IFI27 como un posible corregulador de ER se amplificó el RNAm de este factor mediante la técnica de RT-PCR. Los oligonucleótidos utilizados, así como sus temperaturas de alineación son descritos en la sección de métodos. Como se muestra en la Figura 9, este ensayo dio por resultado la amplificación de un fragmento de DNA de aproximadamente 400 pb. Este resultado concuerda con el tamaño del RNAm de IFI27 cuya secuencia publicada es de 366 pb.

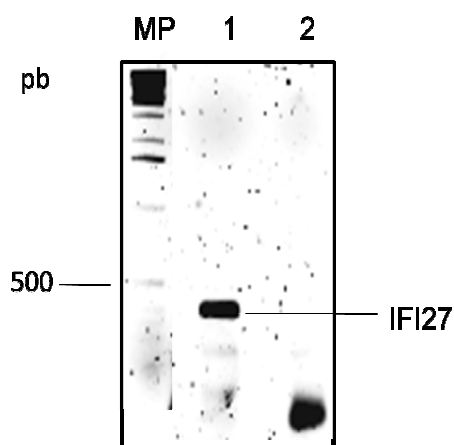


Figura 9. Amplificación por PCR del cDNA de IFI27. Fraccionamiento electroforético del PCR en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. MP Marcador de peso molecular; 1) cDNA de IFI27; 2) Control negativo.

El producto de PCR se precipitó y se ligó al vector pcDNA 3.1(+) previamente digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. La reacción de ligación fue catalizada por la enzima ligasa durante 16 horas a 4°C, después de este tiempo 10 µl de la reacción fueron utilizados para transformar a la cepa XL-1 Blue de *E. coli*. Las colonias resultantes de este procedimiento fueron utilizadas para aislar el vector pcDNA 3.1(+) y determinar la presencia del inserto de IFI27 mediante enzimas de restricción (Figura 10). Para este ensayo se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *XhoI* que son las mismas utilizadas para la inserción del

fragmento de IFI27 en pcDNA3.1 (+). Aquellas preparaciones del vector que dieran por resultado la aparición de una banda de 400 pb aproximadamente, confirmarían la presencia del inserto.

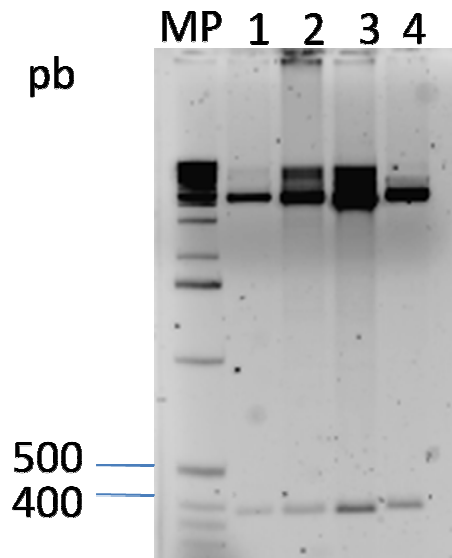


Figura 10. Reacción de digestión con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* de las clonas 1, 2, 3 y 4 de IFI27. Fraccionamiento electroforético de la reacción de digestión en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. MP Marcador de peso molecular.

5.2 Western Blot

Para corroborar que el anticuerpo comercial de IFI27 y el anticuerpo anti ER, detectaban a las proteínas en extractos totales de células HepG2 y MCF7, se realizaron Western Blots, para ello se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida, posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó la inmnodetección por la técnica de quimioluminiscencia (Figura 11).

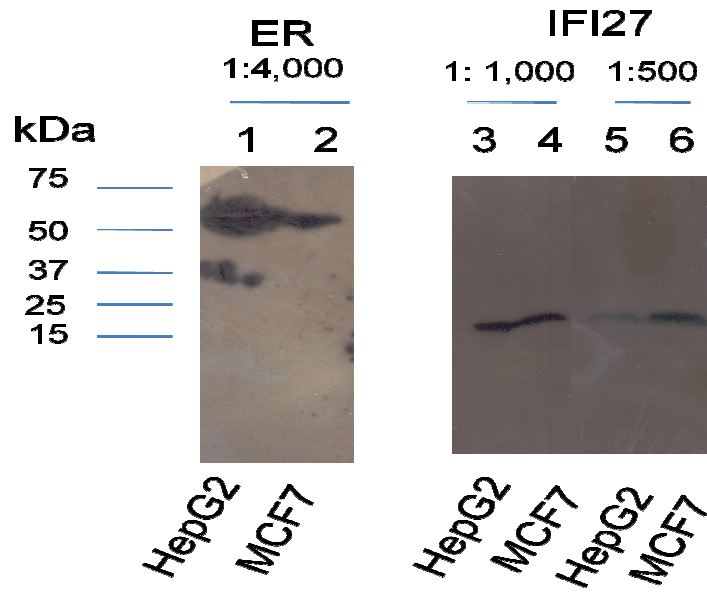


Figura 11. Western Blot. Extractos totales de células HepG2 y MCF7. Inmunodetección de las proteínas IFI27 y ER con anticuerpos comerciales. Carriles 1 y 2 Inmunodetección de ER con un título de anticuerpo 1: 4000; Carriles 3 y 4 Inmunodetección de IFI27 con un título de anticuerpo 1: 1000; Carriles 5 y 6 Inmunodetección de IFI27 con un título de anticuerpo 1: 500; Carriles 1, 3, y 5 Inmunodetección utilizando células HepG2; Carriles 2, 4 y 6 Inmunodetección utilizando células MCF7.

La Figura 11 muestra la inmunodetección de las proteínas ER (carriles 1 y 2) e IFI27 (carriles 3, 4, 5 y 6) de extractos totales de células HepG2 (carriles 1, 3 y 5) y de células MCF7 (carriles 2, 4 y 6). Se utilizó un título del anticuerpo para ER de 1: 4,000 (carriles 1 y 2), y para el caso del anticuerpo de IFI27 se utilizaron dos títulos, 1:1,000 (carriles 3 y 4) y 1:500 (carriles 5 y 6). Los resultados muestran que ambos anticuerpos reconocen a las proteínas en extractos totales de células HepG2 y MCF7 a las concentraciones probadas en este ensayo, debido a que se puede observar la presencia de bandas alrededor de los 66 kDa para el caso de ER y de 15 kDa para IFI27, ya que estos son los pesos moleculares esperados, respectivamente.

5.3 Inmunolocalización de IFI27 en células humanas.

Con respecto a su localización celular, estudios realizados por otros investigadores han reportado la presencia de IFI27 asociada a la membrana externa nuclear, pero hasta el

momento no hay ningún reporte donde la localicen por medio de inmunofluorescencia dentro del núcleo.

Por lo tanto, como una de las hipótesis de este proyecto, se espera que IFI27 colocalice dentro del núcleo con el ER, ya que estudios de histoquímica realizados por el grupo del Dr. León revelaron que la proteína ERAP-1 colocaliza en el núcleo celular con el ER, de tal forma, es posible, que al igual que ERAP-1, IFI27 también colocalice con el ER en el núcleo y así podríamos explicar los resultados obtenidos de las transfecciones transitorias.

Para corroborar esta hipótesis se analizaron dos líneas celulares una de cáncer de mama (MCF7) y otra de hepatocitos humanos (HepG2), se utilizó un anticuerpo específico contra IFI27 marcado con el fluoróforo FITC y otro contra el ER marcado con el fluoróforo Rodamina, también se tiñó el núcleo con DAPI.

Los resultados obtenidos muestran que IFI27 se localiza en el citoplasma y preferencialmente dentro del núcleo, en ambas líneas celulares, al igual que el ER, y además se observa la colocalización de ambas proteínas en el núcleo (Figura 12).

La Figura 12 (A-D) muestra ensayos de inmunolocalización con células HepG2 tratadas sin estradiol, en azul se observa teñido el núcleo (Figura 12A), en verde la proteína IFI27 (Figura 12B), la cual se localiza preferencialmente en el núcleo, aunque también se localiza en el citoplasma, y en rojo el Receptor de Estrógenos (Figura 12C), el cual también se localiza en el núcleo y citoplasma, posteriormente se hizo un superposición de las figuras 12B y 12C para observar si existe colocalización de las proteínas IFI27 y del ER (Figura 12D), se observa colocalización preferencialmente en el núcleo, debido a la coloración amarilla más intensa presente en este organelo sub-celular.

Figura 12

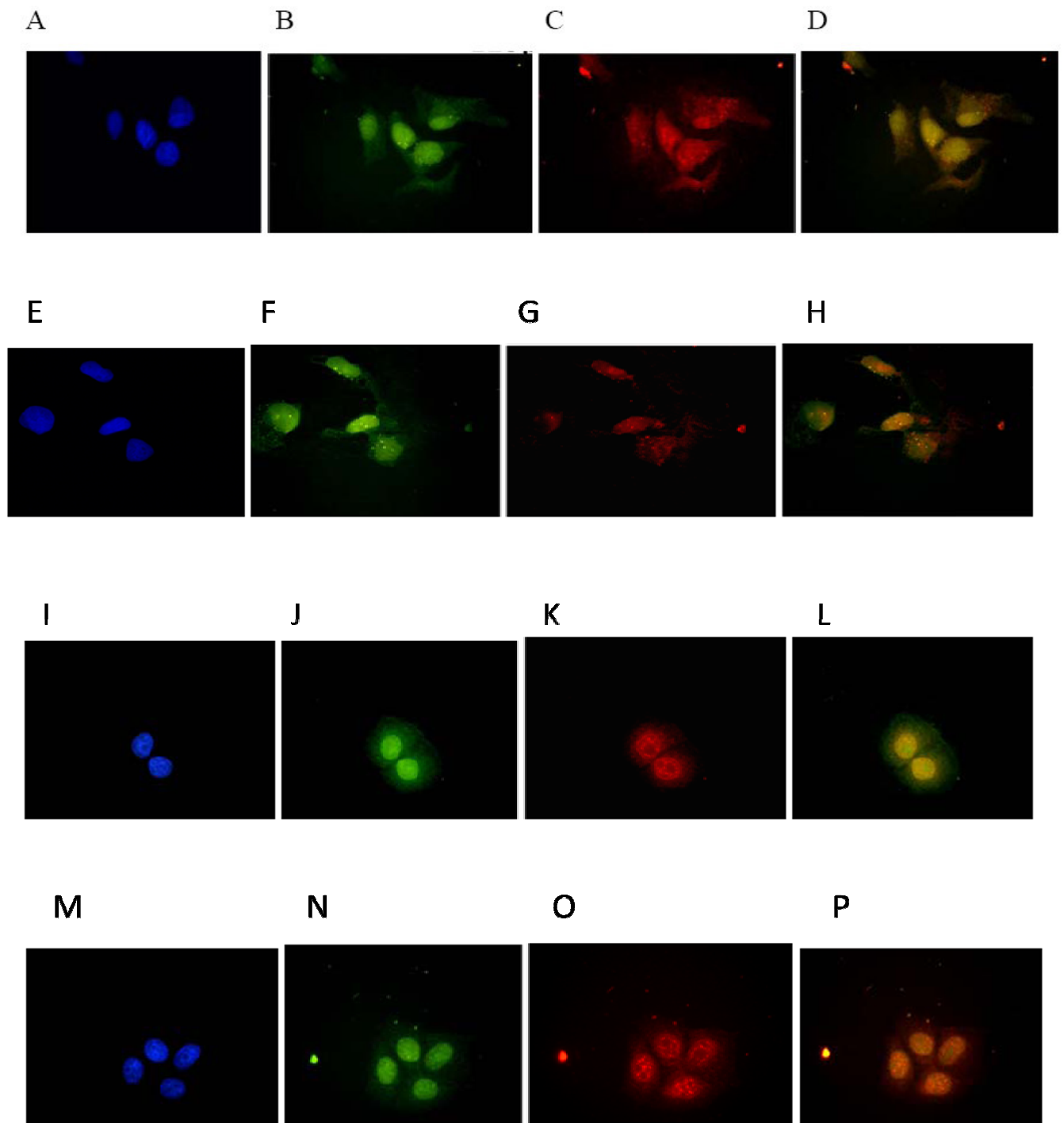


Figura 12. Ensayo de Inmunofluorescencia con células HepG2 (A-H) y MCF7 (I-P) sin ser estimuladas con estradiol (A-D y I-L) y estimuladas con estradiol (E-H y M-P); Tinción del material genético con DAPI (A, E, I y M); Tinción de la proteína IFI27 con el fluoróforo

FITC (B, F, J y N); Tinción de ER con el fluoróforo Rodamina (C, G, K y O); Sobrelapamiento de la proteína IFI27 y ER (D, H, L y P).

La Figura 12 (E-H) muestra un ensayo de inmunofluorescencia con células HepG2 estimuladas con estradiol, el núcleo se tiñó con DAPI (Figura 12E), la proteína IFI27 con verde (Figura 12F), el ER con rojo (Figura 12G) y la Figura 12H muestra un sobrelapamiento de las Figuras 12F y 12G.

La localización de IFI27 se observa mayoritariamente en el núcleo, al igual que el ER, aunque también se observan en el citoplasma; cuando se realiza el sobrelapamiento (Figura 12H), se observa colocalización de ambas proteínas en el núcleo, al igual que las células no estimuladas (Figura 12D).

Es importante notar que las células estimuladas presentan mayor cantidad de gránulos, tanto del ER como del IFI27, las cuales colocalizan dentro del núcleo (Figura 12D y H).

La Figura 12 (I-L) muestra un ensayo de inmunolocalización con células MCF7 sin estímulo, en azul está teñido el DNA con DAPI (Figura 12I), en verde la proteína IFI27 (Figura 12J), la cual se localiza principalmente en el núcleo, aunque también está presente en el citoplasma, el ER se tiñó con un fluoróforo rojo (Figura 12K), éste se encuentra preferencialmente en el núcleo y en su periferia en forma de gránulos, en la Figura 12L, se observa que existe colocalización de IFI27 y del ER en el núcleo, sobretodo en la membrana nuclear en los gránulos antes mencionados.

La Figura 12 (M-P) muestra un ensayo de inmunolocalización con células MCF7 estimuladas con E₂, teñido con DAPI está el DNA (Figura 12M), con verde se tiñó a la proteína IFI27 (Figura 12N), la cual se encuentra preferencialmente en el núcleo, en rojo está teñido el ER (Figura 12O), éste también se localiza mayoritariamente en el núcleo, y al realizar un sobrelapamiento con la Figura 12N y 12O, se observa que existe colocalización de ambas proteínas también en el núcleo (Figura 12P).

En este ensayo donde se estimularon las células con E₂ podemos observar que los gránulos que se observaban en la Figura 12K correspondientes al ER, y que se localizaban sobretodo en la membrana nuclear, ahora se pueden visualizar en el interior del núcleo (Figura 12O) y al realizar el sobrelapamiento con la imagen 12N, que corresponde a la proteína IFI27, podemos ver que hay colocalización de éstos gránulos en el interior del núcleo (Figura 12P), a diferencia de la Figura 12L, en donde no había estímulo y donde la mayor colocalización de estas dos proteínas era en la membrana nuclear.

Con los resultados anteriores podemos proponer que la proteína IFI27 se internaliza al núcleo al ser las células estimuladas con estradiol y de esta forma lleva a cabo su función sobre el ER y además colocaliza dentro del núcleo con éste último.

5.4 Expresión y caracterización funcional de IFI27 en células humanas.

Para determinar el efecto de IFI27 sobre el ER en células humanas, utilizamos la técnica de transfección transitoria mediante la precipitación de fosfato de calcio descrita en la sección de metodología. Como primer paso se realizaron curvas de concentración de DNA para determinar aquellas que fueran ideales para cada uno de los vectores que serían transfectados en la línea celular HepG2. En primer lugar se utilizaron diversas concentraciones del vector pcDNA3.1 que lleva el cDNA del ER. La Figura 13 muestra una curva de concentraciones de ER α , en la que se muestra que 300 ng resultan en la mayor actividad del ER.

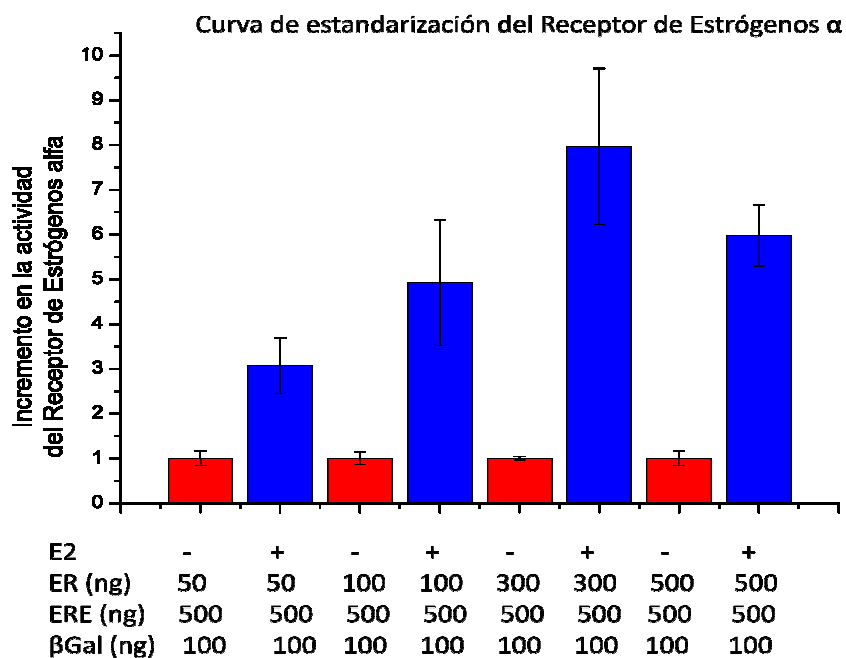


Figura 13. Curva de estandarización de ER en células HepG2. E₂ Estradiol; ER Receptor de Estrógenos; ERE Elemento de Respuesta a Estrógenos, β Gal β -Galactosidasa. n=3.

En esta gráfica se puede observar cómo a medida que se va aumentando la concentración de ER, la actividad transcripcional del mismo también aumenta, cuando se da un estímulo de E₂.

La concentración que muestra una mayor actividad es la de 300 ng, y se observa una disminución en la actividad del receptor cuando se transfecta una concentración de 500 ng, lo que podría indicar que llega un punto donde se satura el sistema.

Posteriormente se realizó una curva de luciferasa (el reportero) (Figura 14).

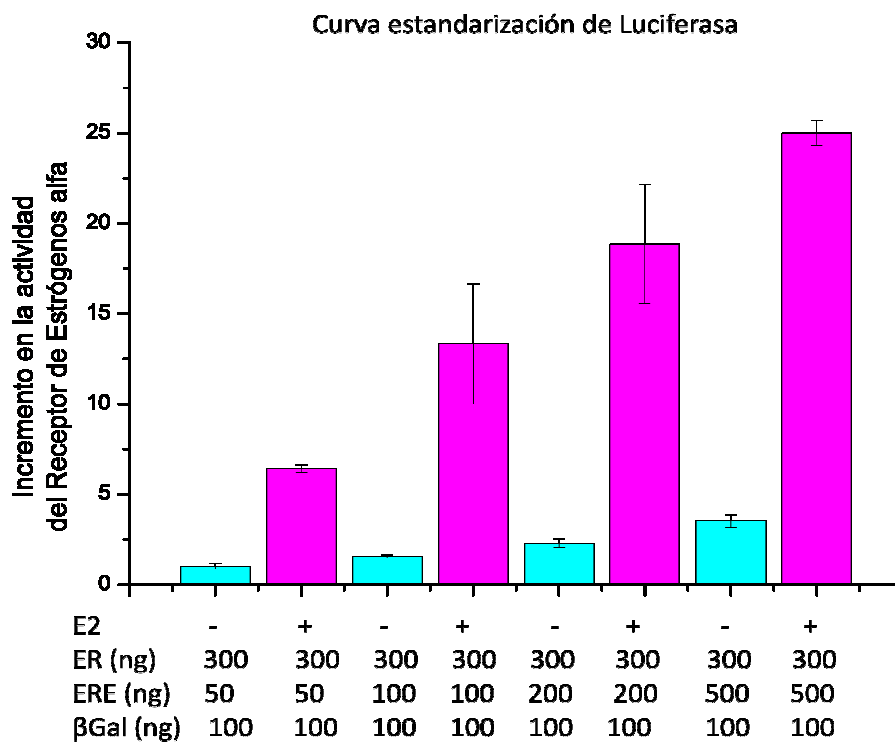


Figura 14. Curva de estandarización de ERE en células HepG2. E₂ Estradiol; ER Receptor de Estrógenos; ERE Elemento de Respuesta a Estrógenos, βGal β-Galactosidasa. n=3.

En esta gráfica podemos observar que a medida que se incrementa la concentración de plásmido que contiene al gen de la luciferasa, aumenta de manera lineal la actividad del receptor de estrógenos, con un estímulo de estradiol, alcanzándose una mayor actividad con la concentración de 500 ng. Cuando no hay estímulo de E₂, se puede observar un pequeño incremento en la actividad del receptor a medida que se aumenta la concentración de luciferasa.

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de los vectores que dirigen la expresión de ER y de luciferasa, la cual actúa como una proteína reportera, procedimos a realizar un experimento encaminado a determinar el efecto de diferentes concentraciones del vector en el que había sido clonado el cDNA de IFI27 (Figura 15).

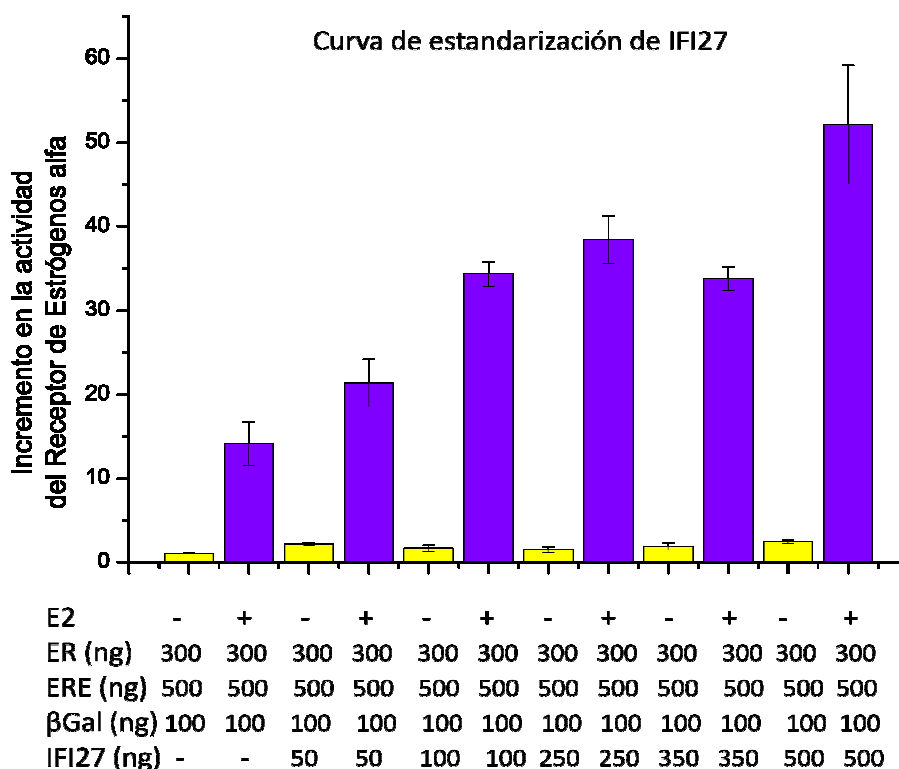


Figura 15. Curva de estandarización de IFI27 en células HepG2. E₂ Estradiol; ER Receptor de Estrógenos; ERE Elemento de Respuesta a Estrógenos; β Gal β -Galactosidasa; IFI27 Proteína inducida por interferón alfa. n=3.

En esta gráfica se observa como a medida que se incrementa la concentración del vector IFI27 de 50 a 500 ng, se incrementa la actividad del ER entre 20 y 50 veces. Estos experimentos nos llevaron a concluir que 500 ng del vector de IFI27 es la concentración donde se observa la mayor actividad de ER bajo las condiciones analizadas, sin embargo, estos datos presentan mayor desviación estándar y a una concentración de 350 ng decae un poco la actividad, es por eso que para los experimentos siguientes, se decidió trabajar con una concentración de 300 ng, además de que otros experimentos no mostrados, presentan variaciones en la actividad del receptor a partir de la concentración de 350 ng.

Con este experimento pudimos observar que la proteína IFI27 que se une al dominio AF-1 de ER, regula de manera positiva a ER, es decir, actúa como un co-activador clásico de ER. Ya que se tuvieron las condiciones de concentración establecidas, y que además se observó que IFI27 regula de manera positiva al ER, se realizó un ensayo donde se comparó el grado de activación de IFI27 sobre ER contra el grado de activación de la proteína SRC-1, el co-activador más potente que se une a la región AF-2 de ER y como control adicional se comparó con la proteína ERAP-1, otro co-activador caracterizado en el laboratorio, que se sabe se une a la región AF-1 de ER. Además este experimento permitirá observar si existe un efecto sinergista entre IFI27 y SRC-1 e IFI27 y ERAP-1 (Figura 16).

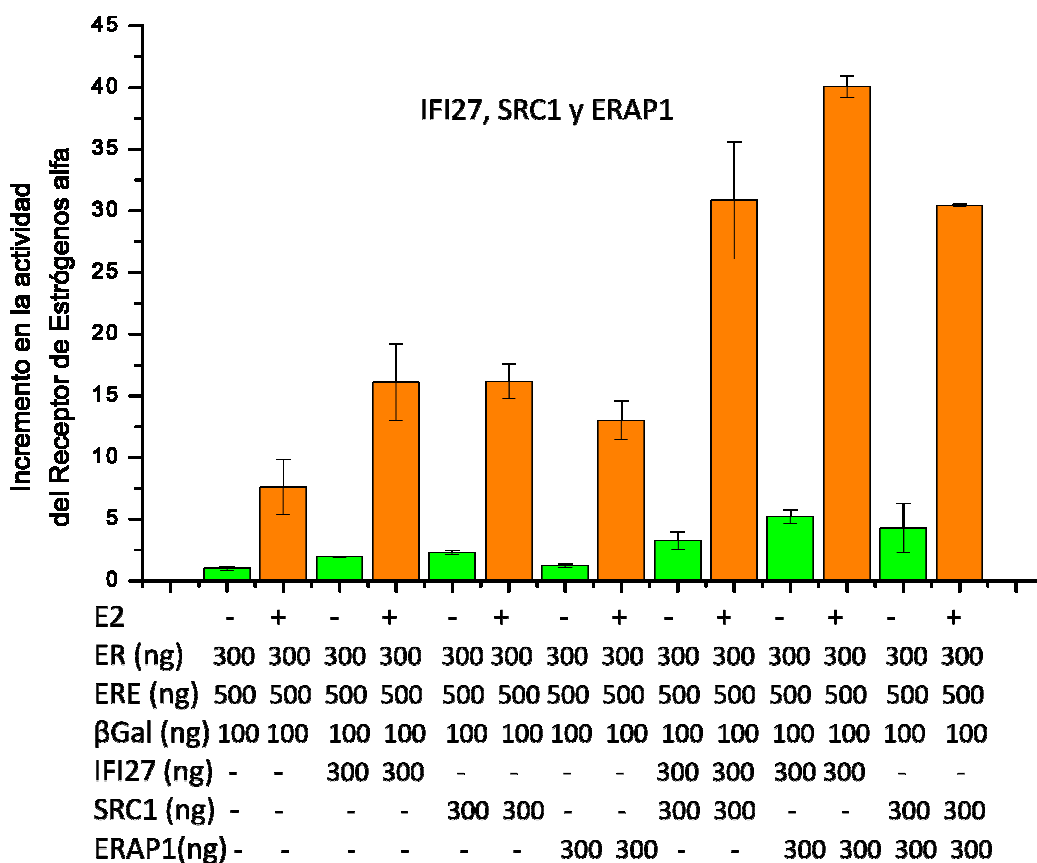


Figura 16. Comparación del aumento en la actividad de ER al transfectar IFI27, SRC-1 y ERAP-1 en células HepG2. E₂ Estradiol; ER Receptor de Estrógenos; ERE Elemento de Respuesta a Estrógenos; βGal β-Galactosidasa; IFI27 Proteína inducida por interferón alfa; SRC1 Co-activador del Receptor Esteroide 1; ERAP1 Proteína Asociada al Receptor de Estrógeno 1. n=3.

El factor IFI27 se comportó como un co-activador de RE de forma equiparable a SRC-1 un co-activador específico de la región AF-2.

Para poner en contexto los resultados de IFI27 sobre ER realizamos un experimento en el cual se transfectaron células HepG2 con el ER solo, y en presencia de IFI27 y SRC-1 (un co-activador que se une al dominio AF-2 del ER perteneciente a la familia de los co-reguladores p-160). En este experimento la estimulación de las células con E₂ resultó en un aumento de 8 veces en la actividad del ER con respecto a las células no estimuladas (Figura 15, barras 1 y 2). La expresión de IFI27 aumentó la actividad del ER en 16 veces con respecto a las células que expresan solamente al ER. Estos resultados son muy interesantes ya que la actividad de SRC-1 fue de 16 veces, muy similar a los resultados obtenidos con IFI27. El papel de SRC-1 como uno de los co-activadores más potentes de ER ha sido caracterizado en detalle por varios investigadores. Estos resultados indican que IFI27 actúa como un co-activador de ER de manera tan eficiente como SRC-1. La diferencia más notable es que mientras SRC-1 reconoce principalmente al dominio AF-2 del receptor, IFI27 parece ser un co-activador del dominio AF-1 de este factor transcripcional.

Debido a que la actividad de ER es la suma de las actividades de sus dominios AF-1 y AF-2 se decidió explorar la posible cooperación entre factores que reconocen a cada una de estas regiones, mediante ensayos de co-transfección de IFI27 y SRC-1. Este experimento demostró que la presencia combinada de estos factores resulta en un aumento de 30 veces con respecto a la actividad inicial del ER en presencia de estradiol y sugiere la posible cooperatividad entre IF27 y factores de la maquinaria transcripcional que se ensambla en AF-2 en respuesta a la presencia de ligando.

Para comparar la respuesta de IFI27 sobre la actividad del ER contra un co-activador previamente caracterizado en nuestro laboratorio, el cual se sabe se une al dominio AF-1, se transfectó a un vector que contenía el cDNA del gen de *ERAP-1*. Los resultados muestran que la proteína ERAP-1 aumenta la actividad de ER 13 veces al ser estimuladas las células con estradiol y que IFI27 la incrementa 16 veces, por lo que podemos concluir que IFI27 es igual o incluso más potente que ERAP-1.

De igual forma como se realizó con SRC-1, decidimos explorar la posible cooperación entre los factores que se unen a la región AF-1, por lo que se co-transfectó a IFI27 y a ERAP-1, el experimento demostró que la presencia de ambos factores resulta en un aumento de 40 veces

con respecto a la actividad de ER sólo en presencia de estradiol, lo que sugiere que podría existir una cooperación entre factores que se unen a la región AF-1 de ER.

Estos experimentos permitieron proponer que IFI27 actúa co-activando al ER de igual forma como lo hace SRC-1 y ERAP-1, los cuales son co-activadores bien caracterizados hoy en día, además de observar un efecto aditivo en la actividad de ER cuando se co-transfectó a IFI27 junto con alguno de estos dos co-activadores, lo que sugiere que pudiera existir una interacción entre la región N-terminal y C-terminal de ER a través del reclutamiento de co-activadores en el dominio AF-1 y AF-2.

DISCUSIÓN

Los RHN están involucrados en gran variedad de procesos biológicos, sin embargo, la desregulación de sus genes o en las vías de señalización conlleva a la generación de diversos tipos de enfermedades entre las que destaca el cáncer de mama.

El ER es un factor de transcripción activado por ligando cuya función es la de fomentar la transcripción de un gran número de genes involucrados en la división celular, diferenciación y en la regulación del metabolismo intermediario. Sin embargo, también es un factor determinante en el desarrollo de cáncer de mama aunque los mecanismos responsables no se comprenden del todo.

Se sabe que el receptor de estrógenos tiene varios dominios funcionales que incluyen a dos dominios de activación transcripcional conocidos como AF-1 y AF-2, localizados en el amino y carboxilo del receptor, respectivamente. La actividad de AF-2 depende de ligando y el mecanismo por el cual activa la transcripción de genes blanco depende del reclutamiento de una serie de co-reguladores del ER entre los que cabe mencionar a la familia de p160 y CBP/p300. Algunos de estos factores tienen la capacidad de actuar como acetil transferasas de histonas, actividad que resulta en la reducción de la afinidad entre nucleosomas y ADN. Esta modificación relaja la estructura de la cromatina y favorece el fácil acceso a la maquinaria basal de transcripción a la región promotora de los genes blanco y por ende su expresión.

Sin embargo, se cree que el dominio AF-1 del ER α puede actuar de manera independiente o sinérgicamente con AF-2 para promover una mejor activación de la transcripción, aunque no ha sido bien establecido cómo los dos factores interactúan con los mismos o con diferentes co-activadores. A pesar de que los miembros de la familia de proteínas p160 han sido originalmente identificados como co-activadores de AF-2, hay mucha evidencia de que podrían estar interactuando y aumentando la actividad de AF-1 (O'Malley *et al.*, 1998; Kushner *et al.*, 1998; Stallcup *et al.*, 1999; Peeters *et al.*, 1999).

Es por esto, que en el laboratorio del Dr. Alfonso León del Río se planteó la hipótesis de que la región AF-1 del ER podría funcionar como un puerto de anclaje para el reclutamiento de complejos multipéptidicos a la región promotora de genes activados por estrógenos, de manera similar a la descrita para el dominio AF-2. Para ello se realizaron experimentos de doble híbrido en levadura, donde se describieron una serie

de factores nombrados ERAP-1-6, los cuales tienen la capacidad de interactuar con el dominio AF-1 del ER α y uno de ellos es la proteína IFI27.

La proteína IFI27 ha sido muy poco estudiada, sin embargo, existen reportes donde la utilizan como marcador tumoral, ya que se han detectado altos niveles del mensajero en un gran número de tumores de pulmón, estómago, mama y colon.

En este trabajo, demostramos que la proteína IFI27 se encuentra localizada en su mayor parte en el núcleo de células humanas y colocaliza con el ER. Este es claramente un requisito necesario para que este factor pueda funcionar como co-regulador del ER, ya que es allí donde el ER realiza sus funciones como factor de transcripción.

Los resultados mostrados en este trabajo demuestran que la sobreexpresión de IFI27 en células humanas resulta en un aumento en la actividad transcripcional mediada por el ER. Para poner en perspectiva esta función de IFI27 sobre el ER se utilizó como control al co-regulador SRC-1, considerado el co-activador más potente del ER y que se une principalmente al dominio AF-2 del receptor. Estos experimentos demostraron que IFI27 no solo actúa como un co-activador de ER sino que es tan eficiente como SRC-1. Es particularmente importante para este estudio que al co-transfectar ambos factores registramos un efecto aditivo sobre la actividad del ER. Desde hace años se sabe que la actividad del ER es el resultado de la cooperación entre los dominios AF-1 y AF-2. Estos resultados sugieren que la cooperatividad entre ambos dominios de activación puede estar mediada por la interacción de proteínas accesorias, co-activadoras, que reconocen de manera independiente estos dominios del receptor.

La principal contribución de este trabajo fue la de descubrir que el factor IFI27 es expresado en el interior del núcleo celular y que puede modificar la actividad del ER a través de su unión con el dominio AF-1, con respecto a los experimentos de doble híbrido realizados previamente por el Dr. Alfonso León. La relevancia de estos resultados estriba en que el dominio AF-1 es importante para el desarrollo de la resistencia al tratamiento hormonal con tamoxifén y al incremento en la formación de tumores en útero y hueso en pacientes con cáncer de mama.

La identificación de IFI27 como un co-activador específico de AF-1 permitirá en el futuro explorar la función de esta proteína en el desarrollo de tumores de mama y en la resistencia al tratamiento con tamoxifén. Estos estudios requieren de acceso a pacientes y deben realizarse con protocolos que permitan seguir el curso de tratamiento de pacientes en hospitales mexicanos.

Por el momento mi trabajo reporta la identificación de un nuevo co-activador del ER y uno de los pocos que se sabe interactúa con la región AF-1. De manera muy importante este nuevo co-activador del ER parece ser tan eficiente como SRC-1 por aumentar la actividad del ER, lo que lo coloca potencialmente como un factor importante en la formación de tumores de cáncer de mama.

Aunque mis resultados no permiten conocer el mecanismo por el cual IFI27 resulta en una mayor actividad del ER, es posible que la unión de este factor junto con otras proteínas ERAP, facilite o establezca el reclutamiento de co-activadores con actividad de acetilasas de histonas como SRC-1. Los resultados presentados en esta tesis demuestran que IFI27 puede actuar de manera aditiva con SRC-1 y ERAP-1, lo cual parece apoyar el modelo anterior (Figura 17).

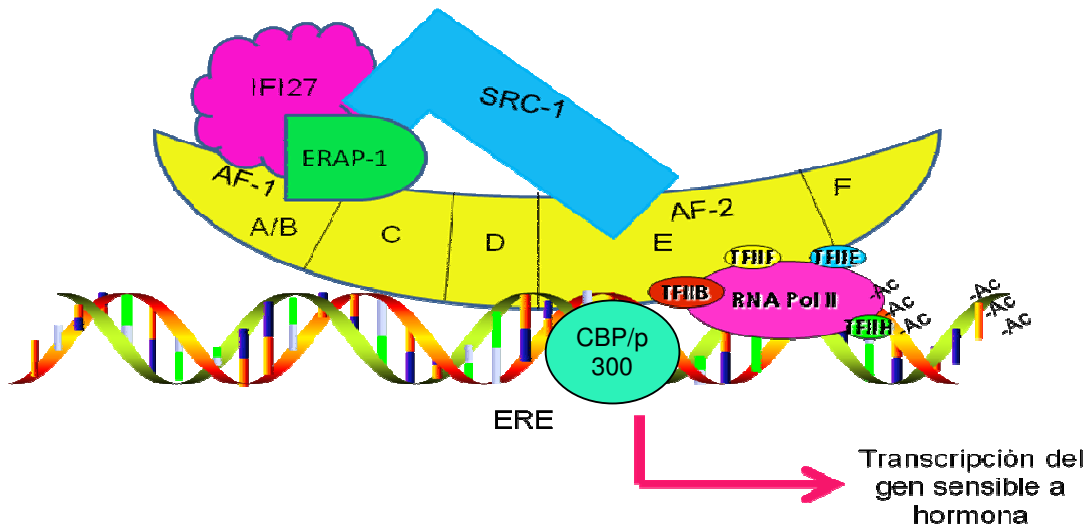


Figura 17. Modelo de interacción de la proteína IFI27 con el ER y otros co-activadores. AF-1 y AF-2 Función de Activación 1 y 2; A/B, C, D, E, F Dominios funcionales del ER; ERAP-1 Proteína asociada al receptor de estrógenos; IFI27 Proteína inducida por interferón alfa; SRC-1 Co-activador del receptor esteroide; CBP/p300 Proteína de unión a CREB; TFIIB, F, E y H Factores de transcripción; RNA pol II RNA polimerasa II; ERE Elemento de Respuesta a estrógeno; Ac Acetilación.

CONCLUSIONES

- ❖ IFI27 se internaliza al núcleo en células HepG2 y MCF7 al ser estimuladas con estradiol donde lleva a cabo su función sobre ER.
- ❖ IFI27 colocaliza con ER dentro del núcleo en células HepG2 y MCF7 estimuladas con estradiol.
- ❖ IFI27 regula de manera positiva la actividad de ER.
- ❖ El efecto de IFI27 sobre la actividad de ER es aún mayor que el mostrado por SRC1, el co-activador más conocido hasta el momento, y también es mayor que el de ERAP-1, el co-activador caracterizado previamente en el laboratorio.
- ❖ Existe un efecto aditivo sobre la actividad de ER entre IFI27 y SRC1 y entre IFI27 y ERAP-1.
- ❖ Existe una interacción entre la región AF-1 y AF-2 de ER mediada a través del reclutamiento de diversas proteínas en ambas regiones.

PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos proponemos varios experimentos que nos permitan tener una visión mas amplia de la función que realiza la proteína IFI27 sobre el ER, creemos que la caracterización de los dominios de interacción entre IFI27 y los dominios AF del ER es muy importante, ya que así podríamos conocer en qué regiones específicas de ambas proteínas hay reconocimiento, esto se realizaría con la técnica de “pull down”.

Otro punto también relevante es conocer si IFI27 forma parte de un complejo multiprotéico ensamblado en AF-1, gracias a mis resultados de transfecciones, pudimos observar que IFI27 actúa de manera conjunta con otras proteínas ERAP en el dominio AF-1, ya que se observa un efecto aditivo al co-transfectarlo con otras proteínas, es por eso que nos atrevemos a pensar que es todo un complejo el que se ensambla en esta región, e IFI27 es un miembro muy importante de éste, esta hipótesis la resolveríamos a través de la técnica de co-inmunoprecipitación.

Finalmente es importante caracterizar el papel de IFI27 como regulador *in vivo* mediante ensayos de ChIP (Inmunoprecipitación de la cromatina), esta técnica nos brindará la oportunidad de conocer de manera *in vivo* cómo se lleva a cabo el mecanismo de reclutamiento de todos los factores involucrados junto con IFI27, en la regulación transcripcional de cierto promotor.

REFERENCIAS

Alen P. F, Claessens, G. Verhoeven, W. Rombauts, and B. Peeters (1999). The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 co-activator-stimulated gene transcription. *Mol. Cel. Biol.* 19:6085–6097.

[Ali S](#), [Coombes RC](#) (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. [Nat Rev Cancer](#). 2:101-12.

Anzick S. L., J. Kononen, R. L. Walker, D. O. Azorsa, M. M. Tanner, X-Y. Guan, G. Sauter, O-P. Kallioniemi, J. M. Trent, and P. S. Meltzer (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 277: 965-8.

Aranda Ana and Pascual Angel (2008). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev*. 81:1269-304.

Bagchi M. K., M-J. Tsai, B. W. O'Malley, and S. Y. Tsai (1992). Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor- dependent gene activation in cell-free systems. *Endocrine Rev*. 13:525–535.

Bannister AJ, Kouzarides T (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*; 384:641–3.

Baron, S., Tying, S. K., Fleischmann, W. R., Coppenhaver, D. H., Niesei, D. W., Kumpel. G. R., Stanton. G. J., and Hughes, T. K. (1991). The interferons: mechanisms of action and clinical applications. *JAMA*, 266: 1375-1383.

Beato M. and A. Sa´nchez-Pacheco (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocrine Rev*. 17:587–609.

Butta A, MacLennan K, Flanders KC, Sacks NPM, Smith I, McKinna A, et al. (1991). Induction of transforming growth factor beta-1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res*; 52: 4261–4264.

Cairns BR. Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. (2001). *Trends Cell Biol*;11:15–21.

[Carthew P](#), [Edwards RE](#), [Nolan BM](#), [Martin EA](#), [Heydon RT](#), [White IN](#), [Tucker MJ](#). (2000). Tamoxifen induces endometrial and vaginal cancer in rats in the absence of endometrial hyperplasia [Carcinogenesis](#). 21:793-7.

Chen H., R. J. Lin, R. L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M. L. Privalsky, Y. Nakatani, and R. M. Evans (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90:569–580.

Chen D., H. Ma, H. Hong, S. S. Koh, S.-M. Huang, B. T. Schurter, D. W. Aswad, and M. R. Stallcup (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284: 2174-7.

Clemons, M. S. Danson and A. Howell (2002). Anti tumor treatment Tamoxifen ('Nolvadex'): a review *Cancer treatment reviews*; 28: 165–180.

Cole MP, Jones CTA, Todd DH (1971). A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI 46474. *Br J Cancer*; 25: 270–275.

Colletta AA, Benson JR, Baum M (1994). Alternative mechanisms of action of anti-oestrogens. *Breast Cancer Res Treat*; 31: 5–9.

Cowan, J. M., Halaban, R., and Francke, U (1988). Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 80: 1159-1164.

Cullen KJ, Lippman ME, Chow D, Hill S, Rosen N, Zwiebel JA (1992). Insulin-like growth factor-II overexpression in MCF-7 cells induces phenotypic changes associated with malignant progression. *Mol Endocrinol*; 6: 91–100.

Diaz, M. O., Ziemin. S., LeBeau, M. M., Pitha, P., Smith, S. D., Chilcote, R. R., and Rowley, J. D (1988). Homozygous deletion of the α - and β -interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5259-5263.

Ding X. F., C. M. Anderson, H. Ma, H. Hong, R. M. Uht, P. J. Kushner, and M. R. Stallcup (1998). Nuclear receptor binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): Multiple motifs with different binding specificities. *Mol. Endocrinol.* 12:302–313.

Dutertre, M. and Smith, C. L (2003) Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor- α : Regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol. Endocrinol.* 17, 1296–1314

Edwards D. P (1999). Coregulatory proteins in nuclear hormone receptor action. *Vitamins Horm.* 55:165–218.

Edwards Dean P (2000). The Role of Coactivators and Corepressors in the Biology and Mechanism of Action of Steroid Hormone Receptors *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 5: 307-324.

Endoh H., K. Maruyama, Y. Masuhiro, Y. Kobayashi, M. Goto, H. Tai, J. Yanagisawa, D. Metzger, S. Hashimoto, and S. Kato (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 19:5363–5372.

Enmark E, Gustafsson J. A. (1999). Oestrogen receptors an overview. *J Intern. Med.* 246:133–38

Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily (1988). *Science* 240:889–895.

Farla, P., Hersmus, R., Trapman, J. and Houtsmuller, A. B. (2005). Antiandrogens prevent stable DNA-binding of the androgen receptor *J Cell Sci* 118: 4187-98.

Fejes-Toth, G., Pearce, D. and Naray-Fejes-Toth, A (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists *Proc Natl Acad Sci.* 95:2973-8.

Freedman L. P (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97:5–8.

Georget, V., Lobaccaro, J. M., Terouanne, B., Mangeat, P., Nicolas, J. C. and Sultan, C. (1997). Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor *Mol Cell Endocrinol* 129: 17-26.

Giles RH, Peters DJ, Breuning MH (1998). Conjunction dysfunction: CBP/ p300 in human disease. *Trends Genet* 14:178–83.

Goto, K., Zhao, Y., Saito, M., Tomura, A., Morinaga, H., Nomura, M., Okabe, T., Yanase, T., Takayanagi, R. and Nawata, H (2003). Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between two distinct subnuclear compartments *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 201-8.

Griekspoor A, Zwart W, Neefjes J, Michalides R (2007) Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cell. *Nucl. Recep. Sign.* 5: 1 -9

Gronemeyer H, Gustafsson J, Laudet V (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3:950-64.

Hall, Julie M. John F. Couse, Kenneth S. Korach (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J of Biol. Chem.* 276: 36869–36872.

Haron EF, Maretzek AF, Goldberg I, Horowitz A, Degani H (1994). Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth. *Cancer Res;* 54: 5511–5514.

Heery D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M. G. Parker (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733–735.

Ho GH, Ji CY, Phang BH, Lee KO, Soo KC, Ng EH. (1998). Tamoxifen alters levels of serum insulin-like growth factors and binding proteins in postmenopausal breast cancer patients: a prospective paired cohort study. *Ann Surg Oncol*; 5: 361–367.

Hong H., K. Kohli, M. J. Garabedian, and M. R. Stallcup (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell. Biol.* 17:2735–2744.

Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE (2000). ICI 182,780 (Faslodex™). Development of a novel, “pure” antiestrogen. *Cancer*; 89: 817–825.

Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D. L. and Hager, G. L (1996). Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera *Proc Natl Acad Sci.* 93: 4845-50.

Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R. and Hager, G. L (1999). Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor *Mol Biol Cell* 10: 471-86.

Jackson, J. K. Richer, D. L. Bain, G. S. Takimoto, L. Tung, and K. B. Horwitz (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol. Endocrinol.* 11:693–705.

James, C. D., He, J., Carlbom, E., Nordenskjold. M., Cavenee, W. K., and Collins, V. P (1991). Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon α and interferon β gene deletions in human glial tumors. *Cancer Res.*, 51: 1684-1688.

Kalhoven E., J. E. Valentine, D. M. Heery and M. G. Parker (1998). Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J.* 17:232–243.

[Kalkhoven E.](#) (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. [Biochem Pharmacol.](#) 68:1145-55.

Kerr, I. M., and Stark, G. R (1991). The control of interferon-inducible gene expression. *FEES Lett.* 285: 194-198.

[Klinge CM](#), [Jernigan SC](#), [Risinger KE](#) (2002). The agonist activity of tamoxifen is inhibited by the short heterodimer partner orphan nuclear receptor in human endometrial cancer cells. [Endocrinology.](#) 143:853-67.

Klochender-Yeivin A, Yaniv M (2001). Chromatin modifiers and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta*;1551:M1–M10.

Kozak, M (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15: 8125-8148,

[Kraus WL](#), [Wong J](#) (2002). Nuclear receptor-dependent transcription with chromatin. Is it all about enzymes? [Eur J Biochem](#). 269:2275-83.

Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J.A (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5925-30.

Kundu TK, Palhan VB, Wang Z, An W, Cole PA, Roeder RG (2000). Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. *Mol Cell*.6:551-61.

Lannigan D (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*. 68:1-9.

Lavery Derek N. and Iain J McEwan (2005). Structure and function of steroid receptor AF-1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem. J.* 391: 449-464.

Lavinsky R. M., K. Jepsen, T. Heinzel, J. Torchia, T-M. Mullen, R. Schiff, A. L. Del-Rio, M. Ricote, S. Ngo, J. Gensch, S. G. Hilsenbeck, C. K. Osborne, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:2920-2925.

Li, H. P. J. Gomes, and J. D. Chen (1997). Receptor-associated coactivator 3, a steroid/nuclear receptor coactivator that is related to steroid receptor coactivator 1 and transcriptional intermediate factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:8479-8484.

Lim, C. S., Baumann, C. T., Htun, H., Xian, W., Irie, M., Smith, C. L. and Hager, G. L. (1999) Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras *Mol Endocrinol.* 13:366-75.

[Lindner DJ](#), [Kolla V](#), [Kalvakolanu DV](#), [Borden EC](#) (1997). Tamoxifen enhances interferon-regulated gene expression in breast cancer cells. [Mol Cell Biochem](#). 167:169-77.

Ma H., H. Hong, S.-M. Huang, R. A. Irvine, P. Webb, P. J. Kushner, G. A. Coetzee, and M. R. Stallcup (1999). Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19:6164-6173.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

Mangelsdorf David J., Carl Thummel, Miguel Beato, Peter Herrlich, Gintner Schiitq Kazuhiko Umesono, Bruce Blumberg, Philippe Kastner, Manuel Mark, Pierre Chambon, and Ronald M. Evan (1995). The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade *Cell*. 83: 835-839.

Marc Robinson-Rechavi, Hector Escriba Garcia and Vincent Laudet (2003). The nuclear receptor Superfamily, *Journal of Cell Science* 116:585-586.

[Martensen PM](#), [Søgaard TM](#), [Gjermandsen IM](#), [Buttenschøn HN](#), [Rossing AB](#), [Bonnievie-Nielsen V](#), [Rosada C](#), [Simonsen JL](#), [Justesen J](#) (2001). The interferon alpha induced protein ISG12 is localized to the nuclear membrane. [Eur J Biochem](#). 268:5947-54.

McInerney E. M., D. W. Rose, S. E. Flynn S. Westin et al. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev*. 12:3357–3368.

McKenna N. J., R. B. Lanz, and B. W. O'Malley (1999). Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular Biology. *Endocrine Rev*. 20:321–344.

Mendelsohn ME, Karas RH (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med*. 340:1801–11

Michalides R, And RJ (1997). Cdk-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88: 405–415.

Mitelman, F., Kaneko, Y, and Trent, J (1991). Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. *Cytogenet. Cell Genet*. 58: 1053-1079.

Montano M. M., K. Ekena, R. Delage-Mourroux, W. Chang, P. Martini, and B. S. Katzenellenbogen (1999). An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 96:6947–6952.

Muramatsu M, Inoue S (2000). Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 270:1–10.

[Muss HB](#), [Hunter CP](#), [Wesley M](#), [Correa P](#), [Chen VW](#), [Greenberg RS](#), [Eley JW](#), [Austin DF](#), [Kurman R](#), [Edwards BK](#) (1992). Treatment plans for black and white women with stage II node-positive breast cancer [Cancer](#). 70:2460-7.

OgryzkoVV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*; 87:953–9.

Oñate S. A., S. Y. Tsai, M-J. Tsai, and B. W. O'Malley (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354–1357.

Pearce, D., Naray-Fejes-Toth, A. and Fejes-Toth, G (2002). Determinants of subnuclear organization of mineralocorticoid receptor characterized through analysis of wild type and mutant receptors *J Biol Chem* 277: 1451-6.

Pettersson and Jan- Ake Gustafsson (2001). Role of Estrogen Receptor Beta in Estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.* 2001. 63:165–92.

Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C., and Samuel, C. E (1987). Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 727-777.

Pinkerton JV, Santen R (1999). Alternatives to the use of estrogen in postmenopausal women. *Endocr. Rev.* 20: 308–20.

Pitha, P. M (1990). Interferons: a new class of tumor suppressor genes? *Cancer Cells.* 2:215-216.

[Rasmussen UB](#), [Wolf C](#), [Mattei MG](#), [Chenard MP](#), [Bellocq JP](#), [Chambon P](#), [Rio MC](#), [Basset P](#) (1993). Identification of a new interferon-alpha-inducible gene (p27) on human chromosome 14q32 and its expression in breast carcinoma. [Cancer Res.](#) 53:4096-101.

Rubinstein JH, Taybi H (1963). Broad thumbs and toes and facial abnormalities. *Am J Dis Child*; 105:588–608.

Russo, G., Isobe, M., Gatti, R., Finan, J., Batuman, O., Huebner, K., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1989). Molecular analysis of a t(14; 14) translocation in leukemic T-cells of an ataxia telangiectasia patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 602-606.

Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson J. A (2000). Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:337–42

Sen, G. C., Lengyel, P (1992). The interferon system. *J. Biol. Chem.*, 267: 5017-5020.

Smith C. L., Z. Nawaz, and B. W. O'Malley (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 11:657–666.

Takeshita, A. N. Kobuchi., G. R. Cardona, C. S. Sven, and W. W. Chin (1997). TRAM-1, a novel 160 kDa thyroid hormone receptor activator exhibits distinct properties from steroid. *J. Biol. Chem.* 272: 27629-34.

Timmermann S, Lehrmann H, Poleskaya A, Harel-Bellan A (2001). Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci*;58:728–36.

Tomura, A., Goto, K., Morinaga, H., Nomura, M., Okabe, T., Yanase, T., Takayanagi, R. and Nawata, H. (2001) The subnuclear three-dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein *J Biol Chem* 276, 28395-401.

Torchia J., D. W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387:677–683.

Tremblay, A., Tremblay, G. B., Labrie, F. and Giguere, V (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell* 3, 513–519

Tyagi, R. K., Lavrovsky, Y., Ahn, S. C., Song, C. S., Chatterjee, B. and Roy, A. K (2000). Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells *Mol Endocrinol* 14, 1162-74.

Urnov, F.D. Wolffe, A.P (2001). A necessary good: nuclear hormone receptors and their chromatin templates. *Mol. Endocrinol USA* 93:5925–30.

Voegel J. J., M. J. S. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15:3667–3675.

Voegel J. J., M. J. S. Heine, M. Tini, V. Vivat, P. Chambon and H. Gronemeyer (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and –independent pathways. *EMBO J.* 17:507–519.

Wagner B. L., J. D. Norris, T. A. Knotts, N. L. Weigel, and D. P. McDonnell (1998). The nuclear corepressors NCoR and SMART are key regulators of both ligand and 8-bromocAMP dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18:1369–1378.

Wakeling AE, Valcaccia B, Newbould E, Green LR (1984). Nonsteroidal antioestrogens-receptor binding and biological response in rat uterus, rat mammary carcinoma and human breast cancer cells. *J Steroid Biochem*; 20: 111–120.

Wang, Z., Frederick, J. and Garabedian, M. J. (2002) Deciphering the phosphorylation ‘code’ of the glucocorticoid receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 26573–26580.

Webb P., P. Nguyen, J. Shinsako, C. Anderson. W. Feng, M. P. Nguyen, D. Chen, S.-M. Huang, S. Subramanian, E. McKinerney, B. S. Katzenellengogen, M. R. Stallcup, and P. J. Kushner (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol. Endocrinol.* 12:1605–1618.

Weiss R. E., J. Xu, G. Ning, J. Pohlenz, B. W. O’Malley, and S. Refetoff (1999). Mice deficient in the steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J.* 18:1900–1904.

Wolffe A. P. (1997). Sinful repression. *Nature* 387:16–17.

Xu J., Y. Qiu, F. J. DeMayo, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC- 1) gene. *Science* 279:1922–1925.

Xu L., C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Cur. Opin. Gene. Dev.* 9:140–147.

Yang XJ (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucl Acids Res*;32:959–76.

Yeh, S., Lin, H. K., Kang, H. Y., Thin, T. H., Lin, M. F. and Chang, C (1999). From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5458–5463

Zeps N, Bentel JM, Papadimitriou JM, D'Antuono MF, Dawkins HJ (1998). Estrogen receptor-negative epithelial cells in mouse mammary gland development and growth. *Differentiation* 62:221–26.

Zeps N, Bentel JM, Papadimitriou JM, Dawkins HJ (1999). Murine progesterone receptor expression in proliferating mammary epithelial cells during normal pubertal development and adult estrous cycle. Association with ERalpha and ERbeta status. *J. Histochem. Cytochem.* 47:1323– 30.

Zwijsen RM, Buckle RS, Hijmans EM, Loomans CJ, Bernards R (1998). Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev* 12: 3488–3498.

APÉNDICE

Medio LB

- Peptona o triptona.....10 g
- NaCl.....10 g
- Extracto de levadura.....5 g
- Agar.....20 g

Disolver los reactivos en agua dd y aforar a 1 L, esterilizar por autoclave.

Medio Alpha MEM para células de cultivo

- 1 sobre de medio alpha MEM (GIBCO).
- Bicarbonato de sodio.....2.2 g
- Agua miliQ estéril.....900 ml

Disolver por 15 min con agitación constante.

- FBS (HyClone).....100 ml
- Antibiótico penicilina/estreptomina (GIBCO).....10 ml

Filtrar dos veces bajo la campana de flujo laminar con filtros de 0.4 y 0.2 μ

PBS/EDTA para células de cultivo

- 1 sobre de PBS (GIBCO)
- Antibiótico penicilina/estreptomina (GIBCO).....10 ml
- Agua miliQ estéril.....1000 ml
- EDTA (0.5 M) pH 8.....2 ml

Filtrar dos veces bajo la campana de flujo laminar con filtros de 0.4 y 0.2 μ .

Para el caso de PBS sin EDTA, éste último no se agrega.

Tripsina/EDTA

- NaCl.....4 g

-KCl.....0.2 g

-EDTA.....0.1 g

-Tris Base.....1.7 g

Ajustar el pH a 7.7

-Tripsina 10X.....3 ml

Ajustar a 500 ml con agua miliQ estéril y filtrar con filtros de 0.2 μ m.

Buffer 2X para precipitar

-Hepes (0.5 M).....15 ml

-KCl (1 M).....1.5 ml

-NaCl (5 M).....8.4 ml

-Glucosa (2 M).....0.9 ml

-Na₂HPO₄.....0.03195 g

Ajustar el pH a 7.05 y aforar con agua miliQ estéril a 150 ml.

Estradiol (10mM)

Pesar 0.0027 g de estradiol y disolverlo en 1 ml de etanol al 100%.

Buffer de lisis

-EDTA (0.5M).....400 μ l (2mM)

-Tritón X (100%).....1 ml (1%)

-KH₂PO₄ (1M) pH 7.8.....10 ml (0.1 M)

-DTT (1M).....100 μ l (1 mM)

Aforar con agua miliQ estéril a 100 ml.

Buffer RX

Para el ensayo de cinco cajas con 6 pozos cada una

- β -galactosidasa.....3.2 ml

-Galactón.....32 μ l

Solución KTME más DTT

Para el ensayo de cinco cajas con 6 pozos cada una

-KTME.....850 μ l

-DTT (1M).....0.85 μ l

Mezcla de reacción para el ensayo de luciferasa

Para el ensayo de cinco cajas con 6 pozos cada una

- KTME.....3.38 ml
- DTT (1M).....3.45 μ l
- ATP (200 mM).....37.5 μ l
- Luciferina (50 mM).....25 μ l

TE

- Tris HCl pH 7.5 (1M).....1 ml (10 mM)
- EDTA (100 mM).....1 ml (1 mM)

PBS 10X

- NaCl.....40.0314 g (1.37 M)
- KCl.....1.0065 g (27 mM)
- Na₂HPO₄*7H₂O.....5.7635 g (43 mM)
- NaH₂PO₄*H₂O.....0.9659 g (14 mM)

Disolver con 300 ml de agua dd

Ajustar a pH 7.3 con NaOH

Aforar a 500 ml

Esterilizar por autoclave

TBS 10X

- Tris Base.....29 g (0.24 M)
- KCl.....1.5 g (20 mM)
- NaCl.....95.35 g (1.63 M)

El TBS-T se prepara de igual forma que el TBS, agregar al final Tween al 1%.

SDS-PAGE

BUFFER DE ELECTROFORESIS 10 X

- Tris30.32 g
- Glicina.....144 g

-SDS.....10 g

Disolver el Tris y la Glicina en agua dd y posteriormente agregar el SDS, aforar a 1 L.

BUFFER DE MUESTRA 2X

-Glicerol.....10 ml (20%)

-SDS1 g (2%)

-Azul de bromofenol0.00125 g (0.0025%)

-β mercaptoetanol.....2.5 ml (5%)

-Buffer apilador 4X.....12.5 ml (25%)

Disolver todos los reactivos excepto el SDS en agua dd, posteriormente agregar el SDS y aforar a 50 ml.

GEL APILADOR

-H₂O.....1.2 ml

-Buffer apilador.....500 µl

-Acilamida.....300 µl

-PSA 20%.....20 µl

-Temed.....4 µl

Buffer apilador 4X:

-Tris-base.....4 g (0.5 M)

-SDS 20%.....0.2 g (0.4%)

Disolver el Tris –base , ajustar a pH 6.8 con HCl y al final agregar el SDS y aforar a 50 ml.

GEL SEPARADOR: 12 %

-H₂O.....3.5 ml

-Buffer separador.....2.5 ml

-Acilamida.....4 ml

-PSA 20%.....25 µl

-Temed.....5 µl

Buffer separador 4X:

-Tris- base18.2 g (1.5 M)

-SDS 20%.....0.4 g (0.4%)

Disolver el Tris –base , ajustar a pH 8.8 con HCl y al final agregar el SDS y aforar a 100 ml.

Buffer de transferencia de proteínas

-Tris.....3 g

-Glicina.....14.4 g

-SDS.....1 g

-Metanol.....200 ml

Disolver en agua dd, aforar a 1 L.

Inmunodetección con quimioluminiscencia

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

-Leche.....10 g (5%)

-Tween 200.2 ml (0.1%)

Disolver en PBS1X y aforar a 200 ml.

SOLUCIÓN DE REVELADO

-Tris 0.5 M pH=8.5.....1 ml

-H₂O.....4 ml

-Solución A.....12.5 µl

-Solución B.....25 µl

-H₂O₂ 10 %.....8.5 µl

Solución A

-Ácido hidroxicinámico.....0.35 g

Aforar a 25 ml con DMSO

Solución B

-Luminol.....1.1 g

Aforar a 25 ml con DMSO.

Extracción de plásmidos

ETC

- NaEDTA (0.5 M).....20 ml (20 mM)
- Tris HCl (1M) pH 9.....25.5 ml (100 mM)
- Rojo de fenol (5%).....300 μ l (0.003%)

SOLUCIÓN I

- LiOH0.839 g (0.2 M)
- SDS.....2 g (2%)

SOLUCIÓN II

- KAc.....58.88 g
- HAc.....22.9 ml

Aforar a 200 ml con agua dd.